

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

#### Réponses à plusieurs niveaux d'organisation biologique de poissons exposés à différentes contaminations environnementales

Mayon, Nicolas

*Award date:*  
2003

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX**

**NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**REPONSES A PLUSIEURS NIVEAUX D'ORGANISATION BIOLOGIQUE DE POISSONS EXPOSES  
A DIFFERENTES CONTAMINATIONS ENVIRONNEMENTALES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Nicolas MAYON

Août 2003



**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: +32(0)81.72.44.18. - Téléfax: +32 (0)81.72.44.20.  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://fundp.ac.be.be/fundp.html>

## **Réponses à plusieurs niveaux d'organisation biologique de poissons exposés à différentes contaminations environnementales**

MAYON Nicolas

### Résumé

Les effets de polluants environnementaux sur la santé des écosystèmes aquatiques impliquent généralement une série de réponses biologiques allant du niveau biochimique à celui des populations ou des communautés. Dans l'optique d'étudier les réponses de poissons exposés à différents types de contaminations environnementales, nous avons réalisé un échantillonnage des communautés ichthyologiques sur six stations du réseau hydrographique wallon altérées à différents degrés. Les populations de chevaine, espèce choisie comme sentinelle, ont également été examinées. Pour l'examen de paramètres relatifs aux niveaux inférieurs d'organisation biologique, nous avons réalisé plusieurs prélèvements d'organes (foie et gonades) et de sang chez quelques-uns des chevaines capturés. Les résultats de nos analyses ont pu montrer qu'il était nécessaire de confronter plusieurs indicateurs correspondant à différents niveaux d'organisation pour obtenir un meilleur aperçu de l'état de dégradation du milieu. Ainsi, une altération des peuplements ichthyologiques a pu être mise en relation avec un déséquilibre dans la structure des populations et l'induction d'une enzyme de détoxification hépatique. L'identification de grandes tendances se marquant à travers l'étude de différents paramètres et l'établissement de liens entre les différents niveaux d'organisation pourraient mener à une meilleure compréhension des mécanismes de réponse à une altération du milieu et permettre d'agir de manière optimale pour améliorer la qualité de nos rivières.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Août 2003

**Promoteur:** P. Kestemont

*C'est en contemplant, avec un petit pincement au coeur, les deux caisses rangées dans un coin de mon « kot » où s'empilent syllabi et notes de cours (souvent photocopiées, béni soit Monsieur Beidler!) que je me suis mis à rédiger ces remerciements... Ainsi, arrivé au terme de ces quatre années d'études, je voudrais remercier tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à ma formation et à mon épanouissement tout au long de ce parcours.*

Je tiens à remercier plus particulièrement le professeur J.-C. Micha de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

*J'exprime toute ma reconnaissance au professeur P. Kestemont, promoteur de ce mémoire, pour son aide, ses conseils, ses remarques et sa disponibilité mais aussi pour son aide sur le terrain, sa bonne humeur et son dynamisme permanent.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à A. Evrard pour son aide, son expérience apportée sur le terrain et les discussions parfois (très) philosophiques lors des trajets. Merci Dédé et longue vie à l'aspro du peuple!*

*Mes remerciements s'adressent également à tous les membres de l'Unité de Recherche en Biologie des Organismes pour les nombreux saluts, clins d'oeil, poignées de mains, blagues et petites discussions au détour d'un couloir, mais aussi (et surtout) pour tous les nombreux conseils reçus lors de la réalisation de ce mémoire. Je tiens tout spécialement à remercier Christelle (LE chef), Fred, Geoffroy, Gersande, Hugo, et Robert pour leur aide au labo et/ou sur le terrain, mais je n'oublie pas tous les autres (« et al. »)! I'd like to thank Xav for his precious help during the RIA! Un grand merci aussi à Martine pour les dosages Lowry et son aide lors des manip' HSP70 de dernière minute ainsi qu' à Marie-Claire pour son expérience et sa disponibilité. Merci aussi à "magik" Gérard pour qui aucun labo n'a de secret! Félicitations à Delphine pour cet heureux évènement! Enfin, merci à François pour sa patience et la qualité de son enseignement tout au long de ces quatre années, bon vent à toi!*

Un tout grand merci à A. Bertrand et O. Carabin du LEAE (Ulg) pour les dosages EROD et PCB ainsi que pour leur participation aux journées de terrain, leur disponibilité et leur bonne humeur.

**Merci à la gentille pharmacienne de l'hôpital de Saint-Mard pour l'héparine prêtée. Pas de merci au sinistre individu qui a dérobé notre héparine à Comblain-la-tour!**

*Je m'en voudrais énormément de ne pas remercier les personnes qui ont participé aux journées de terrain et que je ne nommerai pas ici, par soucis d'omission plus que par manque de place. Un grand merci à tous pour le coup de main, et à charge de revanche, les gars! Un merci tout particulier à Virginie pour sa présence à presque chacune des sorties et à mon papa pour les repas de Chiny, Maboge et Lamorteau!*

Je désire aussi remercier mes « collègues » mémorants d'urbo-logie, en commençant par les dames, **Caro** (franchement, là, c'est exagéré), **Christine** (on n'oublie pas une baffe gaumaise), **Géraldine** (Oui-oui au pays des bonobos), **Stéphanie** (QUOI?), **Van** (au fait, pourquoi tu?) et **Julie**. Chez les mecs, **Eric** (le boss des stats), **Fabien** (à quand la prochaine fondue?), **Johan** (cher beau-frère), **Oli** (pour la cabane près de la brasserie du Bocq), **Robert** (hé! moi j'ai la lchette franche), **Spoon** (quelqu'un connaît son vrai nom?) et **Stéphane** (merci pour les livres de zoologie!). Vous me manquez déjà!

Un petit coucou aux co-koteurs avec qui j'ai vécu des très belles années, et tout spécialement aux « vieux de la vieille » : Roxane et Léon (longue vie à vous deux et plein de bébés!).

*Je remercie mes parents de m'avoir permis de suivre ces études, de m'avoir supporté (dans tous les sens du terme) et d'avoir cru en moi depuis le début. Merci de m'avoir balancé au ruisseau quand j'étais petit! Merci à toute ma famille. Je pense aussi à ceux qui ne sont plus là...*

*À toi Catherine, merci pour tes nombreux encouragements, ton soutien et ton sourire! Qu'est-ce que je ferais sans toi? ;)*



## TABLE DES MATIERES

Résumé

Remerciements

### **INTRODUCTION**

1.

### **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **1. LE BIOMONITORING DE LA QUALITE DE L'ENVIRONNEMENT.**

1.1. Généralités

2.

1.2. Les analyses biocénotiques

2.

1.3. Méthodes basées sur les populations

4.

1.4. Méthodes individuelles et physiologiques

5.

1.5. Etudes multiparamétriques

6.

#### **2. NIVEAUX D'ORGANISATION ETUDIES**

2.1. Indicateurs biochimiques de l'exposition

2.1.1. Le Cytochrome P4501A et l'activité EROD (étoxyrésorufine O-dééthylase)

9.

2.1.2. L'activité GST (Glutathione S-transférase)

12.

2.1.3. La protéine de stress HSP70 (heat-shock protein 70)

13.

2.2. Paramètres de la reproduction

2.2.1. Généralités

15.

2.2.2. Rappel de la physiologie reproductive chez les poissons

16.

2.2.3. Influence des polluants sur les paramètres reproducteurs

16.

2.3. Paramètres des populations

18.

2.4. Analyse des communautés ichtyologiques

19.

#### **3. DESCRIPTION DE L'ESPECE ETUDIEE: LE CHEVAINE (*Leuciscus cephalus*, L.)**

3.1. Description générale

22.

3.2. Utilisation dans le biomonitoring

22.

### **MILIEUX ETUDIES, MATERIEL ET METHODES**

#### **1. MILIEUX ETUDIES**

1.1. Choix des différentes stations

24.

1.2. Description des sites étudiés

1.2.1. Le Ton à Lamorteau

24.

1.2.2. La Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont

25.

1.2.3. La Mehaigne à Wanze

25.

1.2.4. L'Ourthe à Comblain-la-tour

25.

1.2.5. L'Ourthe en amont de Maboge	26.
1.2.6. La Semois à Chiny	26.

## 2. MATERIEL ET METHODES

<u>2.1. Pêches électriques</u>	26.
<u>2.2. Prélèvements sur les chevaines</u>	27.
<u>2.3. Dosage de l'activité EROD</u>	27.
<u>2.4. Dosage des PCB</u>	27.
<u>2.5. Dosage de l'activité GST</u>	28.
<u>2.6. Dosage des protéines de stress HSP70</u>	28.
<u>2.7. Dosage des stéroïdes sexuels plasmatiques (testostérone, 11-kétotestostérone et 17β-oestradiol).</u>	30.
<u>2.8. Indices de condition</u>	30.
<u>2.9. Etude des populations de chevaines</u>	30.
<u>2.10. Descripteurs biologiques des communautés ichthyologiques</u>	31.
<u>2.11. Analyses statistiques</u>	32.

## RESULTATS

### 1. PARAMETRES MORPHOLOGIQUES ET CONDITION GLOBALE

<u>1.1. Facteur de condition</u>	33.
<u>1.2. Rapport hépato-somatique</u>	33.
<u>1.3. Rapport gonado-somatique</u>	33.

### 2. INDICATEURS BIOCHIMIQUES DE L'EXPOSITION

<u>2.1. Concentration en PCB dans les muscles de chevaines</u>	34.
<u>2.2. Activité EROD</u>	34.
<u>2.3. Activité GST</u>	35.
<u>2.4. Protéines de stress HSP70</u>	36.

### 3. CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN STEROÏDES SEXUELS

<u>3.1. 11-kétotestostérone (11-KT)</u>	36.
<u>3.2. Testostérone (T)</u>	37.
<u>3.3. 17 β-Oestradiol (E2)</u>	37.

### 4. ETUDE DES POPULATIONS DE CHEVAINES 37.

### 5. ETUDE DES COMMUNAUTES ICHTYOLOGIQUES

<u>5.1. Structure globale des peuplements ichthyologiques</u>	38.
<u>5.2. Etude des peuplements à l'aide de descripteurs biologiques</u>	
5.2.1. Métrique relative à la diversité : nombre total d'espèces	39.
5.2.2. Métriques relatives à l'altération de l'habitat benthique	40.
5.2.3. Métrique relative à la sensibilité à la qualité de l'eau : nombre d'individus intolérants	41.



<b>DISCUSSION</b>	42.
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	50.
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

# INTRODUCTION



Avec l'essor des activités humaines, notre environnement est continuellement soumis à des pollutions chimiques produites par les industries, l'agriculture ou les agglomérations urbaines. Durant le 20<sup>ème</sup> siècle, de nombreux xénobiotiques comme les biphényles polychlorés (PCB), les pesticides organochlorés ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont été produits et partiellement rejetés dans l'environnement. Elément constitutif du milieu, l'eau est une ressource vitale pour tous les êtres vivants. Elle est aussi devenue le récepteur terminal de la plupart des polluants.

Ces polluants peuvent causer chez les poissons une variété de réponses biologiques allant du niveau biochimique aux niveaux des populations et des communautés. Ainsi, on sait depuis longtemps qu'une altération du milieu est susceptible d'induire des changements dans la structure des communautés en place. De nombreux indices « biotiques » ont d'ailleurs été développés et utilisés avec succès dans des programmes de surveillance de la qualité de l'environnement. Parallèlement à ces méthodes étudiant les niveaux d'organisation biologique supérieurs, les biologistes de ces 20 dernières années se sont penchés sur l'étude de paramètres appartenant à des niveaux d'organisation inférieurs. De cette manière, des paramètres moléculaires, cellulaires et physiologiques ont été étudiés comme indicateurs potentiels d'une altération du milieu.

Le présent travail a pour objectif de déterminer si, après l'étude de différents paramètres mesurés sur des poissons capturés dans des sites plus ou moins altérés, nous pouvons mettre en évidence de grandes tendances qui se marquent entre les différents niveaux d'organisation biologique.

Pour ce faire, nous avons sélectionné 6 stations sur le réseau hydrographique wallon, ces stations étant altérées à différents degrés par différents types de contaminants. Des pêches électriques y ont été menées dans le but de réaliser un inventaire des peuplements ichtyologiques en place. De plus, les populations de chevaines (*Leuciscus cephalus*), espèce proposée par plusieurs auteurs (Devaux *et al.*, 1998 ; Flammarion *et al.*, 2002) pour le monitoring des rivières, ont été étudiées. Cette espèce a également fait l'objet de prélèvements d'organes (foie et gonades) et de sang pour l'étude de paramètres relatifs aux niveaux d'organisation inférieurs, c'est-à-dire l'activité de deux enzymes de détoxification : l'étoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) et la glutathione-S-transférase (GST), les concentrations hépatiques en protéines de stress HSP70, les concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels (11-kétotestostérone ou 11-KT, testostérone ou T et 17  $\beta$ -oestradiol ou E2) ainsi que trois indices de condition : le facteur de condition (K), le rapport hépato-somatique (RHS) et le rapport gonado-somatique (RGS).

La première partie de ce travail consiste en une synthèse bibliographique dans laquelle nous examinerons d'abord l'état actuel des connaissances en matière de biomonitoring de l'environnement. Nous nous pencherons ensuite sur les différents niveaux d'organisation étudiés : les indicateurs biochimiques de l'exposition, les paramètres de la reproduction, l'étude de populations et l'analyse des communautés ichtyologiques. Enfin, une description du chevin et une révision de son utilisation dans les études de biomonitoring seront réalisées. Nous décrirons les sites échantillonnés et exposerons le matériel et les méthodes utilisées au cours de cette étude dans la seconde partie du travail. La troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus. Ceux-ci seront discutés dans le quatrième chapitre.



## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

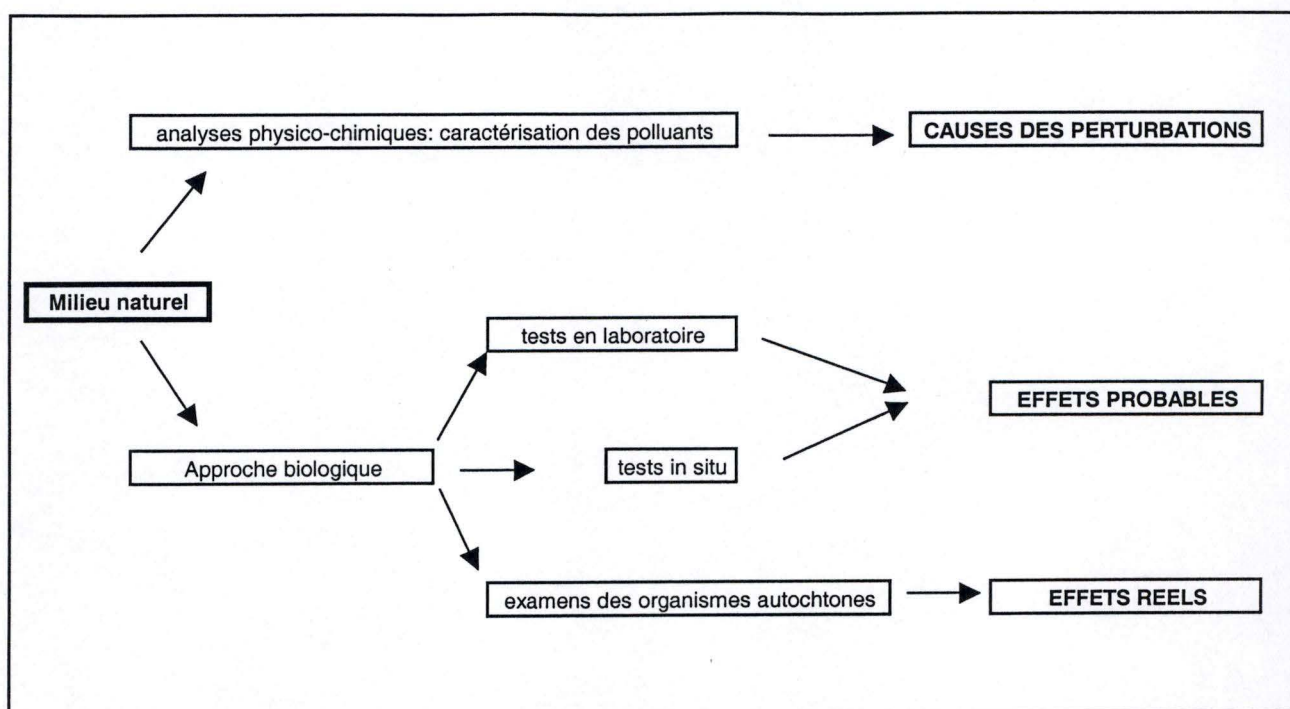


Fig.1 : Complémentarité des méthodes physico-chimiques et biologiques (modifié d'après Descy et Darchambeau, 1999).

Tab.1 : Différentes zones de la méthode des saprobies (Angelier, 2000).

Polysaprobe	Pollution organique élevée. — Développement massif de Bactéries chimio-organotrophes ( $10^6/\text{ml}$ ) — Faibles concentrations en $\text{O}_2$ — Présence d'ammoniac et hydrogène sulfuré. — Nombre d'espèces faible. — Dominance des Invertébrés détritivores (Chironomidae, Oligochètes Tubificidae) — Quasi absence des producteurs primaires ( $P/R < 1$ ).
$\alpha$ -Mésosaprobe	Forte pollution organique. — $10^3$ à $10^6/\text{ml}$ Bactéries chimio-organotrophes. Composés organiques : oses, acides aminés, sels ammoniacaux. Apparition de Bactéries tirant leur énergie de l'oxydation de l'ammoniac et des nitrites — Chironomidae et Tubificidae majoritaires. Nombre d'espèces plus élevé que dans la zone polysaprobe.
$\beta$ -Mésosaprobe	Charge organique faible. Les Bactéries chimio-organotrophes régressent au profit des Bactéries autotrophes (nitrificatrices), de même que les Invertébrés détritivores. Accroissement de la richesse spécifique — Concentration en $\text{O}_2$ proche de la saturation.
Oligosaprobe	Absence presque totale de charge organique — Prédominance des producteurs primaires et consommateurs non détritivores. Richesse spécifique élevée — Retour à la saturation de la concentration en $\text{O}_2$ . ( $P/R > 1$ ).
Xénosaprobe	Absence totale de charge organique



# 1. LE BIOMONITORING DE LA QUALITE DE L'ENVIRONNEMENT

## 1.1. Généralités

La surveillance de la qualité d'un milieu aquatique est une discipline qui peut être abordée selon deux approches bien distinctes mais complémentaires (fig.1). La première est la détection des **causes** des altérations, basée sur des analyses physico-chimiques et sur la détection - voire la quantification - d'éventuels polluants dans le compartiment de l'écosystème étudié (Descy & Darchambeau, 1999). Cependant, une telle approche nécessite souvent des moyens très perfectionnés, coûteux et lourds à mettre en œuvre (Lam & Gray, 2003). De plus, il convient de souligner l'aspect réducteur des analyses physico-chimiques qui ne représentent qu'un " cliché " des conditions à un moment donné alors que celles-ci sont extrêmement variables (Micha & Noizet, 1982). La seconde approche vise à évaluer les **effets** des altérations. Cette méthode est une approche biologique du milieu ou biomonitoring, et ce à différents niveaux d'organisation (Micha, 1982). Son grand avantage est d'intégrer dans le temps et l'espace les effets de la pollution, mais elle ne fournit cependant qu'une mesure globale de la pollution. Pour savoir quels polluants sont en cause, l'analyse physico-chimique est indispensable. (Descy & Darchambeau, 1999).

## 1.2. Les analyses biocénotiques

Dans des milieux où les conditions physico-chimiques sont relativement homogènes, une association d'espèces est susceptible de se mettre en place après un certain temps, sur base de relations complexes établies entre les espèces elles-mêmes et leur milieu. Si les conditions restent stables, la communauté biologique se maintiendra, par contre si les conditions sont modifiées, la communauté pourra changer. En d'autres termes, toute modification de la biocénose reflète des variations de son environnement ; ce qui permet d'affirmer que les biocénoses sont indicatrices d'environnements typiques (Micha, 1982).

Historiquement, les premiers indices biocénotiques étaient basés sur l'hypothèse qu'une rivière non polluée qui a reçu une charge ponctuelle élevée en matières organiques présente, en aval, des zones de pollution décroissante (tab.1). Un niveau de *saprobité* a donc été défini en terme de composantes abiotiques (oxygène, matière organique) et biotiques (espèces rencontrées dans les différentes zones) (Kolkwitz & Marson, 1908). Les eaux polysaprobies, à l'aval immédiat du rejet abritent de nombreuses bactéries hétérotrophes (e.g. *Sphaerotilus*) capables d'épurer une grande quantité de matière organique ainsi que des invertébrés peu exigeant quant à l'oxygène disponible tels les diptères chironomidés ou les oligochètes tubificidés. Le gradient aval passe par des eaux mésosaprobies  $\alpha$  puis  $\beta$  pour devenir oligosaprobies une fois que la charge organique est totalement assimilée. Ces eaux abritent une faune d'eau non polluée tels les plécoptères ou les éphéméroptères (Angelier, 2000). Cependant, vu ses nombreuses limites (Micha, 1982), notamment le fait qu'elle ne s'intéresse qu'à la pollution organique, la méthode des saprobies a été progressivement abandonnée pour faire place à des indices plus performants (Descy & Darchambeau, 1999).

A partir de ce système se sont développés plusieurs indices fondés sur la classification de différents taxa selon leur sensibilité à l'altération du milieu. Les macro-invertébrés benthiques sont des organismes qui ont souvent été utilisés en raison de leur diversité taxonomique, trophique et écologique, de leur durée de vie assez longue, de leur relative



Tab.2 : Indice biotique de Tuffery et Verneaux (1968) (Angelier, 2000).

Groupes faunistiques		Nombre total d'Unités systématiques présentes				
		0-1	2-5	6-10	11-15	>15
		Indice biotique				
1. Plécoptères ou Ecdyonuridae	> 1 US 1 seule US	– 5	7 6	8 7	9 8	10 9
2. Trichoptères à fourreau	> 1 US 1 seule US	– 5	6 5	7 6	8 7	9 8
3. Ancyliidae Éphéméroptères sauf Ecdyonuridae	> 2 US 1 ou 2 US	– 3	5 4	6 5	7 6	8 7
4. Aphelocheirus Odonates, Gammaridae ou Mollusques (sauf Sphaeriidae)	Toutes les US ci-dessus absentes	3	4	5	6	7
5. Asellus, Hirudinées, Sphaeriidae ou Hémiptères (sauf Aphelocheirus)	Toutes les US ci-dessus absentes	2	3	4	5	–
6. Tubificidae ou Chironominae <i>thummi-plumosus</i>	Toutes les US ci-dessus absentes	1	2	3	–	–
7. Eristalinae	Toutes les US ci-dessus absentes	0	1	1	–	/

US : Unités systématiques



sédentarité et de leur facilité d'échantillonnage. Tuffery et Verneaux (1967) ont ainsi développé l'Indice Biotique (IB), qui a eu de nombreuses applications en écologie aquatique (Micha, 1982 ; Dewandel, 1994 ; Everaerst-Poll & Vanden Bosche, 2000). Cet indice se base sur un tableau (tab.2) dont les lignes correspondent aux groupes faunistiques classés en 7 catégories dans un ordre de résistance à la pollution, et dont les colonnes correspondent à des classes de richesse taxonomiques. Le croisement d'une ligne et d'une colonne donne une valeur chiffrée comprise entre 0 et 10 correspondant au score IB pour la station échantillonnée. En Europe, il existe plusieurs versions dérivées de l'IB (Danemark, Allemagne, Belgique, Espagne, Portugal, ...), avec des adaptations nécessitées à la fois par la répartition géographique des organismes, les types de cours d'eau ou le climat (Angelier, 2000). En Belgique, l'Indice biotique belge (IBB, NBN T92-402, 1984) s'inspire directement de l'IB. La faible discrimination dans les groupes faunistiques rend cependant cet indice peu sensible et peu précis. On lui préférera souvent une nouvelle forme de l'indice qui, ayant subi plusieurs améliorations et normalisations, est proposée comme référence dans les applications en routine : l'Indice Biologique Global Normalisé, ou IBGN (AFNOR, 1992). Les macro-invertébrés benthiques ne sont pas les seuls organismes qui ont été utilisés avec ce type d'indices biocénétiques. Ainsi, certains biologistes se sont intéressés à d'autres bioindicateurs comme les diatomées (Descy & Coste, 1991). Notons que les indices considérant les végétaux comme bioindicateurs sont très sensibles aux pollutions par les composées de l'azote et du phosphore, mais pas aux altérations physiques du milieu (Angelier, 2000), ni aux pollutions toxiques (Descy & Darchambeau, 1999). Le principal inconvénient de ce type d'indice biocénétique est lié au système de référence : ils comparent en effet toujours les échantillons à un peuplement idéal donné par le tableau sans prendre en compte les caractéristiques naturelles des sites étudiés (Descy & Darchambeau, 1999).

C'est en tentant de résoudre ce problème que des chercheurs britanniques ont développé le RIVPACS, River Invertebrate Prediction And Classification (Wright *et al.*, 2000). Le principe de cette méthode est d'utiliser un jeu de mesures sur plusieurs variables environnementales pour prédire la faune de macro-invertébrés que l'on retrouverait idéalement sur le site échantillonné en l'absence de pollution, ce qui constitue la condition de référence, propre à un site donné. En comparant la faune effectivement observée et la faune attendue prédite par le modèle, on obtient une estimation de la qualité biologique du site. L'étape de prédiction a été rendue possible grâce à une grande quantité de mesures, de prélèvements et d'analyses statistiques. D'autres indices basés sur la prédiction d'une faune attendue ont été développés à travers le monde. C'est notamment le cas de AUSRIVAS en Australie (Davies, 2000, in Wright *et al.*, 2000) et de BEAST dans le Nord de l'Amérique (Reynoldson *et al.*, 2000, in Wright *et al.*, 2000).

A l'inverse de ces indices qui considèrent seulement la structure globale des peuplements, plusieurs indices biocénétiques ont été développés sur base d'une approche centrée sur l'utilisation de plusieurs descripteurs biologiques, ou métriques pour décrire les communautés en place. Le premier indice d'intégrité biologique a été mis au point par Karr (1981) et était basé sur les communautés ichtyologiques. Cet indice est caractérisé par son aspect multiparamétrique : plusieurs métriques réparties en catégories sont utilisées pour décrire la biocénose en place et le score total de l'indice correspond à la somme des cotes attribuées individuellement à chaque métrique. Le score attribué à chacun des paramètres est évalué en lumière de ce qui pourrait être attendu pour un site non altéré situé dans une région biogéographique similaire pour un cours d'eau de taille comparable. L'évaluation des scores demande donc l'établissement d'un système référentiel propre à chaque entité géographique, ou écorégion, qui permettra de définir les valeurs maximales attendues pour chaque



Tab.3 : Indicateurs d'une réponse au stress au niveau de la population et ses effets sur les communautés (Attrill & Depledge, 1996).

Indicator	Input to community
(a) Density/abundance	Size of population in community at any one time
Biomass	
Size structure	
Growth	
(b) Fecundity	Persistence in community over time
Sex ratio	
Reproductive life span	
Age of maturity	
Generation time dispersal	
(c) Physiological adaptability	Indirect input to (a) and (b)
Genetic diversity	
Body condition	



paramètre. De tels indices possèdent de ce fait un champ d'application limité à une écorégion donnée. La plupart des paramètres sont établis sur base de la classification par guildes (ensemble d'individus utilisant les mêmes ressources d'un milieu donné) des taxons étudiés. Il s'agit d'une méthode optimale pour classer les différentes espèces selon plusieurs critères inhérents à leurs exigences écologiques propres. Les organismes pourront être classés en guildes reproductives, trophiques, de tolérance ou d'habitat.

Ces indices biocénétiques multiparamétriques sont surtout utilisés avec les communautés ichthyologiques (Karr, 1981, Karr *et al.*, 1986) avec de nombreuses adaptations pour des écorégions différentes (Oberdorff & Hughes, 1999). L'utilisation des poissons pour évaluer la qualité du milieu sera approfondie ultérieurement mais il convient toutefois de noter que d'autres organismes peuvent être considérés et que d'autres indices multiparamétriques ont été utilisés. Simon (2003) publia récemment un ouvrage regroupant plusieurs études utilisant des indices multiparamétriques. Ceux-ci s'intéressaient aux macro-invertébrés (Invertebrate Community Index, ou ICI ; Benthic Index of Biotic Integrity, ou B-IBI ; Macroinvertebrate Multimetric Index, ou MMI), aux macrophytes aquatiques, ou aux diatomées. Bryce *et al.* (2002) utilisèrent les communautés d'oiseaux pour évaluer la qualité des milieux rivulaires (Bird Integrity Index, ou BII). Enfin, Simon *et al.* (2000) utilisèrent les communautés de poissons, d'écrevisses et d'amphibiens pour estimer l'état de dégradation de petits étangs et de marécages nord-américains.

### **1.3. Méthodes basées sur les populations**

Une population peut être définie comme l'ensemble des individus d'une même espèce qui occupent un même écosystème (Caquet & Lagadic, 1998). Les populations représentent le *pool* de gène d'une espèce, sa diversité génétique. C'est pour cette raison que ce niveau d'organisation est au centre des politiques de conservation de la biodiversité (Bickham *et al.*, 2000). Les contaminations environnementales ont été identifiées comme des responsables importants d'une série d'effets négatifs sur la diversité génétique des populations : induction de mutations transmissibles, effets génétiques sur les cellules somatiques et germinales, changements dans la fréquence allélique, etc. (Bickham *et al.*, 2000). Tout ceci aboutissant à plus long terme au déclin de la population. Bickham *et al.* (2000) ont d'ailleurs recensé une série d'exemples d'altérations génétiques dues aux xénobiotiques sur différentes populations naturelles. Li Ma *et al.* (2000) remarquaient également une baisse de diversité génétique et un faible degré de polymorphisme dans des populations de moules de l'Atlantique (*Mytilus galloprovincialis*) et de balanes (*Balanus glandula*) vivant sur des sites à forte activité industrielle.

Plusieurs études ont mis en évidence les effets d'une pollution sur certains paramètres des populations (tab.3). Ainsi, Paoletti & Cantarino (2001) ont remarqué des sex-ratios différents dans des populations d'isopodes oniscidés (*Trachelipus rathkei*) exposés ou non à des pratiques culturales intensives. Arukwe (2001) remarquait également ce phénomène chez plusieurs poissons exposés à diverses contaminations. Dans leur étude sur l'impact de la pollution sur les populations de patelles (*Patelloida saccharina*, *Patelloida pygmaea*), Liu & Morton (1998) ont constaté que les populations vivant dans des sites fortement altérés possédaient une densité plus faible et une période de recrutement plus courte que celles des sites de référence. Une autre étude (Kramarz & Stark, in press) évaluant les effets du cadmium et d'un insecticide (imidalcloprid) sur des populations de pucerons (*Aphidius ervi*, *Acyrtosiphon pisum*) a montré l'impact négatif de ces polluants sur le taux de croissance. Moe *et al.* (2002) observèrent même des effets positifs dépendant de la densité dans des



Tab.4 : Principaux processus dont l'altération éventuelle par un polluant est susceptible de perturber le fonctionnement des individus et de la population (Lagadic *et al.*, 1998).

Fonction	Processus pouvant être perturbé au niveau	
	individuel	interindividuel
Reproduction	Orientation Équilibre Activité locomotrice Régulation (hormones) Acquisition des caractères sexuels primaires et secondaires Gonadogenèse. Gamétogenèse Développement des embryons Parturition Utilisation optimale de l'énergie : métabolisme, allocation des ressources	Agrégation Recherche de partenaires sexuels Accouplement Émission des gamètes Parade Nidification Capacités de prédation
Développement et Croissance	Recherche et prise de nourriture Tactismes divers Équilibre Activité locomotrice Apprentissage Régulation : facteurs de croissance Utilisation optimale de l'énergie : métabolisme, allocation des ressources, <i>fitness</i>	Couvaion Nourrissage des jeunes Apprentissage des jeunes Protection vis-à-vis des facteurs du milieu
Survie	Recherche et prise de nourriture Tactismes divers Orientation Équilibre Activité locomotrice Mécanismes homéostatiques Détoxication, capacité de réparation tissulaire, résistance aux parasites et aux maladies	Agression Protection vis-à-vis des facteurs du milieu Protection vis-à-vis des prédateurs ou des parasites



populations de mouches (*Lucilla sericata*) exposées au cadmium. Cependant, la plupart des travaux étudiant les populations se basent sur la structure d'âge, véritable indicateur de l'état de santé de la population. Ce paramètre fera l'objet d'un développement ultérieur.

#### **1.4. Méthodes individuelles et physiologiques**

Selon Munkittrick & McCarty (Caquet & Lagadic, 1998), les effets écotoxicologiques au niveau d'une population découlent pour l'essentiel d'une altération des performances individuelles d'une partie au moins des individus qui la composent. Cette notion de performance recouvrant une série de fonctions regroupées dans le tableau 4. Ainsi, certains paramètres susceptibles de perturber ces fonctions ont été étudiés au niveau individuel par plusieurs auteurs.

Des perturbations de l'orientation, de l'équilibre ou de l'activité locomotrice peuvent être à l'origine d'effets négatifs sur les fonctions de reproduction, de croissance ou de survie (Caquet & Lagadic, 1998). L'étude des performances natatoires chez les poissons peut révéler des perturbations de ces processus (McGeer *et al.*, 2000). Certains polluants peuvent perturber les processus de nutrition : des anomalies ont été observées dans la construction de toiles par des araignées exposées à des substances toxiques (Caquet et Lagadic, 1998) ; Weis *et al.* (2003) ont constaté que le taux de capture de proies par des larves de fondule (*Fundulus heteroclitus*) était significativement altéré par une exposition à différents polluants tels que les métaux lourds ou les PCB ; enfin, des taux d'assimilation de nourriture différents ont été observés chez des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposées à différents métaux (McGeer *et al.*, 2000).

Certains indices utilisant un rapport entre le poids de certains organes et le poids total du corps peuvent mettre en évidence une altération du milieu. Le rapport gonado-somatique (Hugla, 1994 ; Janz *et al.*, 1997 ; Sepúlveda *et al.*, 2002), le rapport hépato-somatique (Adams *et al.*, 1996 ; Porter & Janz, 2003) ou le rapport viscero-somatique (Siligato & Böhmer, 2001) ont été utilisés dans plusieurs études écotoxicologiques. Il en va de même pour le facteur de condition, rapport entre le poids du corps et le cube de sa longueur totale (Soimasuo *et al.*, 1995 ; Aaltonen *et al.*, 2000). Certains auteurs utilisent même un indicateur de l'état de santé des individus tel que le Fish Health Index (Schlenk *et al.*, 1996) ou le Health Assessment Index (Kovacs *et al.*, 2001). De tels indices sont basés sur plusieurs paramètres révélateurs de l'état général des individus comme l'examen externe de la peau, des yeux ou des branchies, la valeur hématocrite, le taux de protéines plasmatiques, la couleur de la bile, etc. (Kovacs *et al.*, 2001).

Notons enfin l'utilisation d'organismes possédant des caractéristiques biologiques particulières dans des tests d'écotoxicité. Un exemple marquant est l'emploi du gymnote (*Apteronotus albifrons*) dans la détection des pollutions aquatiques par les variations de la fréquence et de la forme des signaux électriques émis par le poisson (Thomas *et al.*, 1996).

En dépit des nombreux avantages que présentent les méthodes d'évaluation de l'état de santé de l'environnement basées sur des analyses à des niveaux élevés d'organisation biologique, celles-ci présentent un inconvénient majeur : elles ne permettent de poser un diagnostic qu'à posteriori, c'est-à-dire quand la perturbation a déjà provoqué des changements significatifs dans la structure ou le fonctionnement des communautés et/ou des populations en place (Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). Il est généralement admis que les réponses physiologiques précèdent les changements aux niveaux d'organisation supérieurs (Lam &



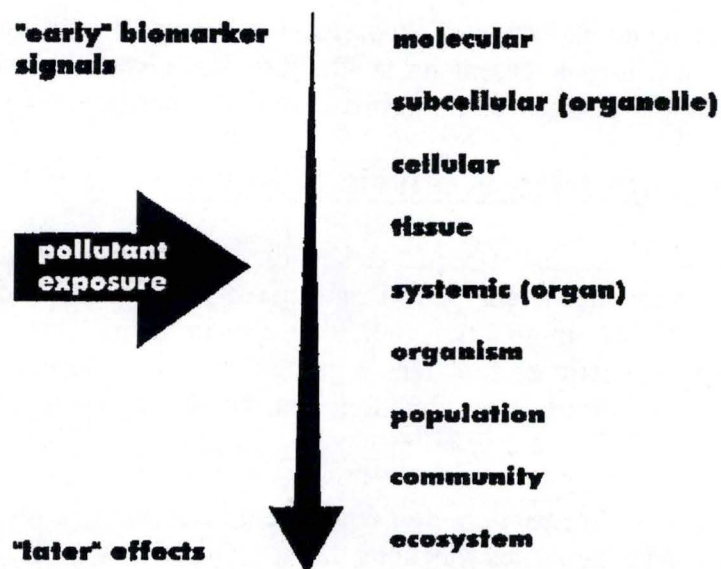


Fig.2 : Représentation schématique de la séquence de réponses à une contamination dans un système biologique (van der Oost *et al.*, 2003).

Tab.5 : Utilisation de différentes réponses physiologiques en tant que biomarqueurs de la contamination de l'environnement dans différentes études.

Type d'indicateur	Biomarqueur	Organisme	Contamination	Auteurs
Biochimique	EROD	Corégone lavaret ( <i>Coregonus lavaretus</i> )	effluents d'usines papetières	Soimasuo <i>et al.</i> , 1995
	ECOD	Barbeau ( <i>Barbus barbus</i> )	PCB	Hugla <i>et al.</i> , 1995
	GST	Carpe ( <i>Cyprinus carpio</i> )	PCB et organochlorés	Van der Oost <i>et al.</i> , 1998
	HSP70	White sucker ( <i>Catostomus commersoni</i> )	effluents d'usines papetières	Janz <i>et al.</i> , 1997
	HSP90	Vairon américain ( <i>Pimephales promelas</i> )	Lindane	Dyer <i>et al.</i> , 1993
	Métallothionéines	divers	métaux lourds	Cosson & Amiard, 1997
	acetylcholine esterase	Limande ( <i>Limanda limanda</i> )	organophosphorés et carbamates	Galgani & Bocquené, 1997
	divers enzymes métaboliques	Truite fario ( <i>Salmo trutta</i> ) et Loche franche ( <i>Noemacheilus barbatulus</i> )	Pesticides, HAP, PCB et métaux	Konradt & Braunbeck, 2001
Histopathologique	ultrastructure des branchies, du foie et des reins	Truite fario ( <i>Salmo trutta</i> ) et Loche franche ( <i>Noemacheilus barbatulus</i> )	Pesticides, HAP, PCB et métaux	Gernhöfer <i>et al.</i> , 2001
	ultrastructure des gonades	Barbeau ( <i>Barbus barbus</i> )	PCB	Hugla, 1994
	ultrastructure du foie	Barbeau ( <i>Barbus barbus</i> )	PCB	Thomé <i>et al.</i> , 1993
Endocrinien	vitellogénine	<i>Platichrys flesus</i>	PCB et HAP	Janssen <i>et al.</i> , 1997
	17 $\beta$ -oestradiol	<i>Platichrys flesus</i>	HAP	Monteiro <i>et al.</i> , 2000
	testostérone	White sucker ( <i>Catostomus commersoni</i> )	effluents d'usines papetières	Janz <i>et al.</i> , 1997
	11-kétotestostérone	Achigan ( <i>Micropterus salmoides floridanus</i> )	effluents d'usines papetières, pesticides, PCB et métaux lourds	Sepúlveda <i>et al.</i> , 2002



Gray, 2003 ; van der Oost *et al.*, 2003) (fig.2). Dans cette optique, de nombreuses études ont été menées au cours des vingt dernières années pour déterminer la pertinence d'une utilisation de réponses à des niveaux inférieurs pour évaluer l'état de santé d'un milieu (Triebkorn *et al.*, 2001). Ces réponses constitueraient des signaux précoces de l'altération de l'environnement (Lam & Gray, 2003 ; van der Oost *et al.*, 2003). On définit habituellement un biomarqueur comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997).

Les avantages liés à l'utilisation des biomarqueurs dans le monitoring des pollutions sont multiples. En plus du fait qu'ils constituent des réponses précoces à la contamination d'un milieu, ils renseignent sur les mécanismes d'action des polluants (Lam & Gray, 2003). De plus, si certains biomarqueurs se contentent de prouver qu'un système donné subit un stress quelconque, d'autres, relativement spécifiques, permettent de cerner le(s) contaminant(s) inducteur(s) parmi les substances xénobiotiques présentes dans le milieu (Lagadic *et al.*, 1997). Ce sont des outils puissants et sensibles qui donnent une vision intégrative dans le temps et dans l'espace de la dynamique des polluants dans le milieu (Lagadic *et al.*, 1998). Ils constituent enfin une méthode économique du monitoring des polluants permettant de contourner le nombre important d'analyses et les coûts élevés des mesures de contaminants présents dans le milieu (Lagadic *et al.*, 1998 ; Lam & Gray, 2003).

Malgré ces avantages, l'utilisation des biomarqueurs dans le monitoring de l'environnement possède également des inconvénients. Le plus important demeure certainement l'interférence avec d'autres facteurs environnementaux, considérés comme des facteurs de confusion (Amiard *et al.*, 1998 ; van der Oost *et al.*, 2003). Relativement réduite en expérimentation *in vitro*, c'est-à-dire sous conditions fortement contrôlées, cette influence est beaucoup plus importante dans le milieu naturel où de nombreux facteurs sont susceptibles de moduler l'induction de certains biomarqueurs (Monod, 1997). Ainsi, les interférences avec les facteurs environnementaux abiotiques (climat, caractéristiques physico-chimiques, ...) et biotiques (compétition, prédation, ...), les effets combinés (synergiques ou antagonistes) des xénobiotiques ainsi que les caractéristiques biologiques des individus (état physiologique, stade de maturation sexuelle, particularités génétiques, ...) peuvent rendre délicate l'interprétation des réponses de biomarqueurs (Amiard *et al.*, 1998 ; Lagadic *et al.*, 1998). Amiard *et al.* (1998) notaient également les difficultés d'interprétations liées à l'absence de véritables valeurs contrôles. De fait, l'une des caractéristiques essentielles de la pollution d'origine humaine consiste en sa dispersion importante par les courants marins et atmosphériques de sorte qu'il n'existe plus à l'heure actuelle d'écosystèmes exempts de traces de l'activité de l'Homme.

Le tableau 5 reprend quelques études proposant l'utilisation de réponses physiologiques en tant que biomarqueurs pour la surveillance de l'environnement.

## **1.5. Etudes multiparamétriques**

Devant la complexité des écosystèmes et de l'ensemble des relations qui les structurent et qui assurent son fonctionnement, le monde scientifique s'est progressivement rendu compte de l'insuffisance d'une approche focalisée sur un seul niveau d'organisation biologique pour évaluer l'état de santé d'un milieu. Ainsi, plusieurs auteurs ont réalisé l'intérêt d'une approche holistique, c'est-à-dire basée sur plusieurs niveaux d'organisation,



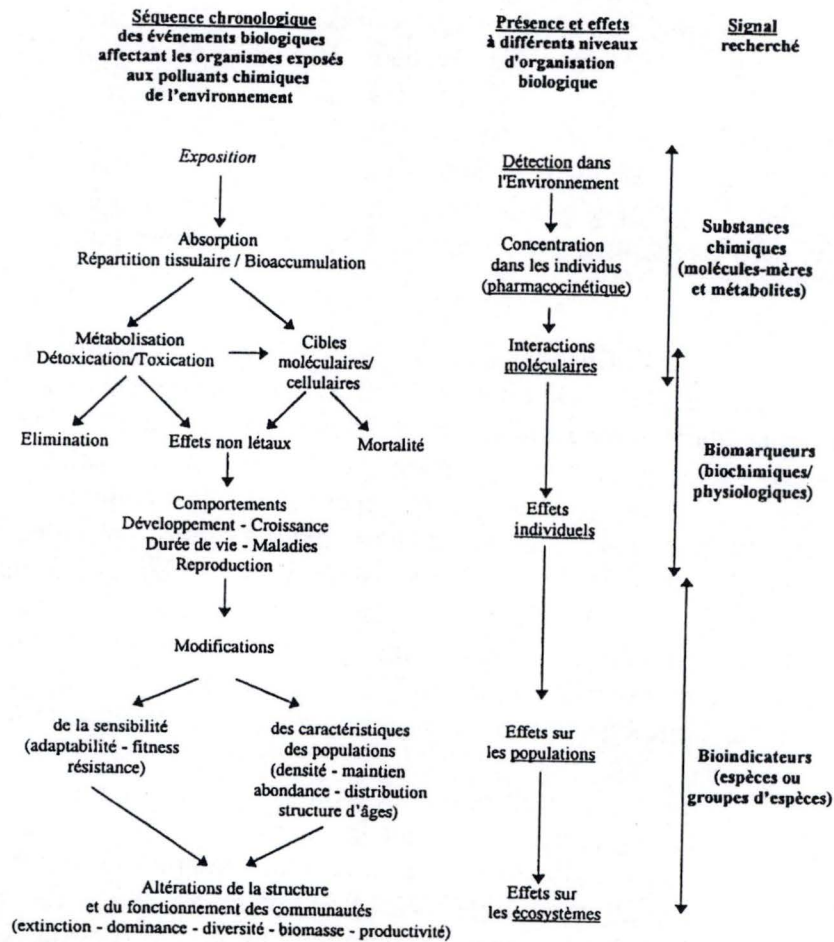


Fig.3 : Chronologie théorique des effets induits par un polluant introduit dans le milieu naturel (Lagadic *et al.*, 1997)

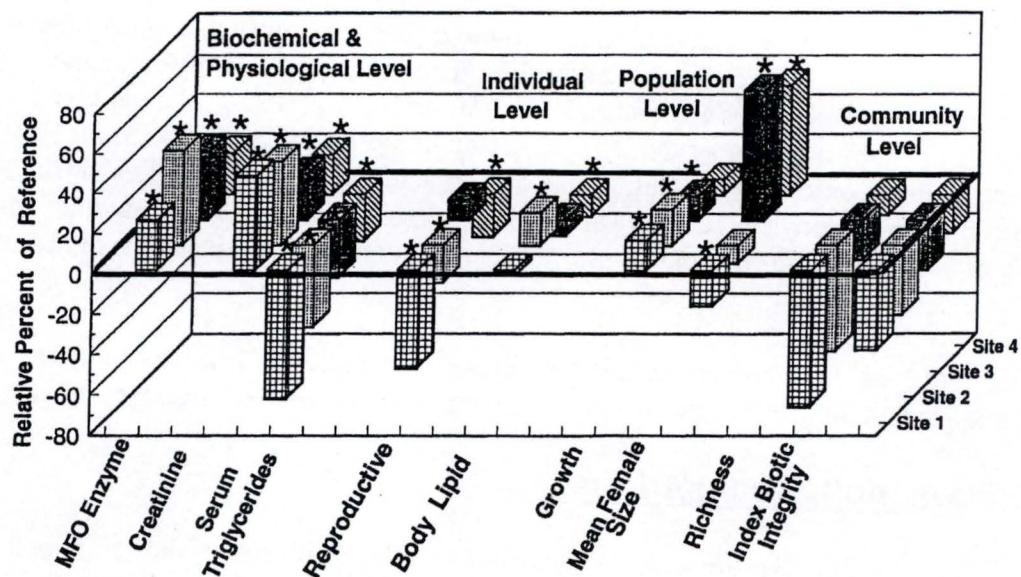


Fig.4 : Réponses à différents niveaux d'organisation biologique le long d'un gradient de contamination chez des poissons exposés à des effluents d'usines papetières. Les sites se disposent le long d'un gradient aval, le site 1 se trouve en aval direct du rejet, suivent alors les sites 2, 3 et 4. \* indique une différence significative par rapport au site de référence (Adams *et al.*, 2000).



pour le suivi de la qualité de l'environnement (Adams *et al.*, 1992, 1996, 2000 ; Lagadic *et al.*, 1997, 1998 ; Kovacs *et al.*, 2001 ; Porter & Janz, 2003 ; Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). En effet, la structure d'un écosystème aquatique peut être définie comme une succession de niveaux d'organisation où chaque compartiment contrôle l'organisation du niveau supérieur (Attrill & Depledge, 1997). La contamination du milieu toucherait donc plusieurs niveaux du système en modifiant plus ou moins fortement la structure du niveau sous-jacent (fig.3). Cependant, s'il n'est pas surprenant que les organismes montrent, lors d'une pollution, des réponses aux faibles niveaux d'organisation (biochimiques ou cellulaires), il est moins évident que ces mêmes changements affectent réellement les niveaux supérieurs (van der Oost *et al.*, 2003). A l'inverse, l'étude des niveaux d'organisation plus élevés ne permet pas de révéler les mécanismes sous-jacents ayant conduit à la structure observée (Attrill & Depledge, 1997). Dans ce cas, seule une approche combinant l'utilisation d'indicateurs biologiques à différents niveaux d'organisation est capable de fournir une image suffisamment réaliste de l'état de santé écologique d'un milieu (Lagadic *et al.*, 1997).

Plusieurs études ont évalué les effets de contaminations environnementales à différents niveaux d'organisation. Kosmala (1998) adoptait une approche intégrant plusieurs niveaux d'organisation pour évaluer l'impact des effluents de stations d'épuration. Adams *et al.* (2000) remarquaient des similitudes dans l'évolution de réponses biologiques à différents niveaux d'organisation le long d'un gradient de contamination (fig.4). Ces similitudes semblent indiquer, d'après les auteurs, l'existence de relations causales entre les réponses à différents niveaux d'organisation. Dans une étude plus ancienne (Adams *et al.*, 1992), les réponses obtenues à différents niveaux permettaient à l'auteur de conclure que le procédé principal par lequel des effluents d'usines papetières affectaient les populations ichtyologiques d'une rivière du Tennessee était un dysfonctionnement de la reproduction et du recrutement. Ainsi, la rareté apparente des jeunes classes d'âge chez le redbreast sunfish (*Lepomis auritus*) était mise en parallèle avec de faibles niveaux d'oestradiol chez les femelles et un taux élevé d'ovocytes atrétiques. De plus, un recrutement plus faible entraînait une compétition intraspécifique moins importante, permettant aux survivants de disposer de plus de ressources, ce qui se traduisait par un taux de croissance plus élevé que dans les populations des sites de référence. Schlenk *et al.* (1996) ont examiné chez des poissons d'une rivière de l'Arkansas les corrélations entre différents biomarqueurs hépatiques (activité EROD, concentration en cyt.P450 (CYP1A), niveaux de la protéine de stress HSP30 et concentration en ARNm codant pour une métallothionéine) et divers descripteurs de l'état de santé des individus, des populations et des communautés ichtyologiques (abondance, richesse spécifique, diversité spécifique). Quelques corrélations significatives entre certains biomarqueurs (CYP1A, HSP30) et l'état de santé des poissons ont été mises en évidence.

Enfin, un groupe de scientifiques allemands ont récemment mis sur pied le projet VALIMAR (Triebkorn *et al.*, 2001) visant à valider l'utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement tout en insistant sur d'éventuelles extrapolations entre niveaux d'organisation biologique, des indicateurs biochimiques au niveau des communautés. Les chercheurs se sont concentrés sur deux espèces sentinelles, la truite fario et la loche franche. Ils ont pu montrer que les réponses étaient généralement plus sensibles chez la première que chez la seconde. Les expériences ont été menées aussi bien *in vivo* que *in vitro*, mais aussi en conditions semi-naturelles (encagement et rivière artificielle). Les sites étudiés étaient deux petites rivières du sud-ouest de l'Allemagne. Les biomarqueurs testés étaient très variés, allant des protéines de stress (Köhler *et al.*, 2001) aux changements histopathologiques et ultrastructuraux du foie, de la rate et des reins (Gernhöfer *et al.*, 2001) en passant par de nombreuses activités enzymatiques, dont les activités des enzymes de



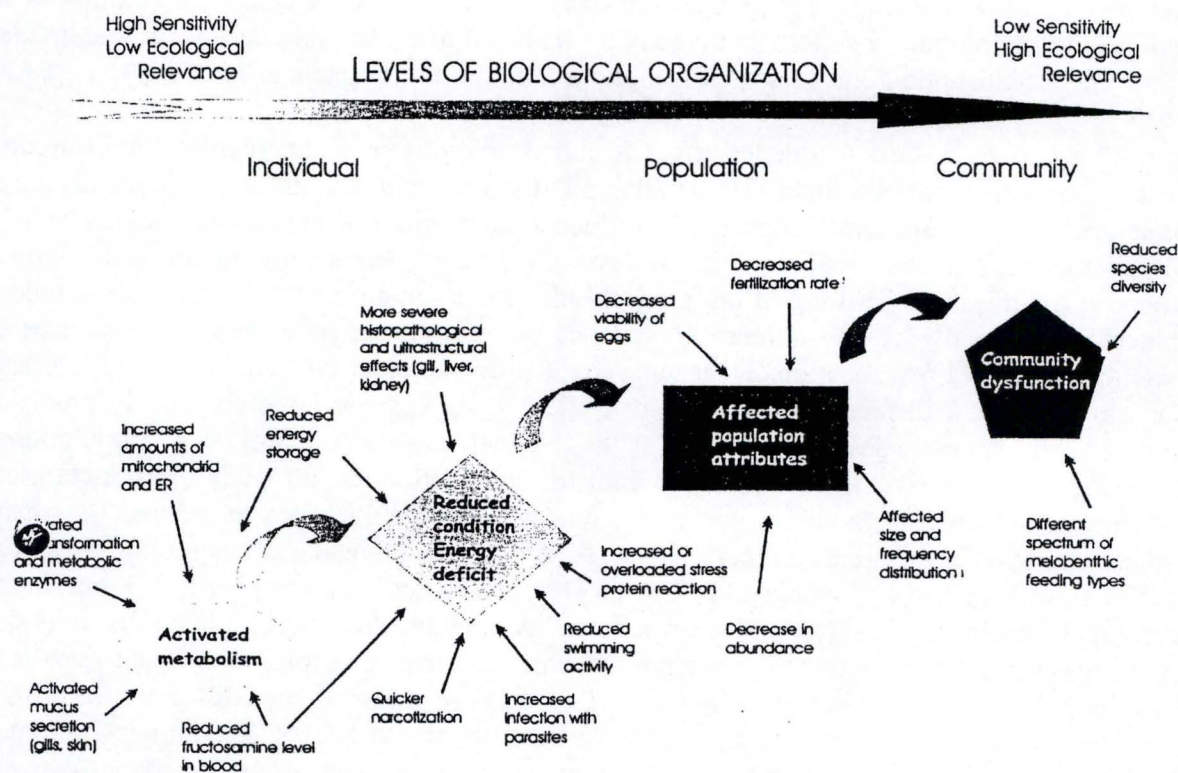


Fig. 5: Relations entre réponses à différents niveaux d'organisation chez les espèces sentinelles étudiées par le projet VALIMAR (Triebkorn *et al.*, 2001).



biotransformation de phases I et II (Behrens & Segner, 2001). Des analyses physico-chimiques de l'eau ont également été menées. Les populations de truites fario et de loches franches ont été étudiées tout comme les communautés ichtyologiques (Böhmer & Siligato, 2001). Les résultats du projet ont été publiés dans 15 articles interconnectés (*Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, vol. 8, n° 3-4). Les analyses physico-chimiques concluaient que les deux cours d'eau différaient significativement l'un de l'autre. En général, les réponses de biomarqueurs indiquaient que les poissons de la rivière la plus polluée montraient les symptômes d'un métabolisme activé, de déficiences énergétiques et de faible condition globale. Les auteurs ont également montré que la variabilité temporelle était plus importante pour les indicateurs biochimiques que pour des indicateurs à des niveaux d'organisation plus élevés. Les études de populations ont montré de sévères perturbations dans la structure des populations des deux espèces sentinelles sur le cours d'eau pollué, et ce essentiellement pour les stades jeunes. Les auteurs sont donc arrivés à la conclusion qu'il existait des liens entre les différents niveaux d'organisation et qu'il était possible d'observer une tendance similaire en étudiant des indicateurs de stress à plusieurs niveaux d'organisation biologique (fig.5).

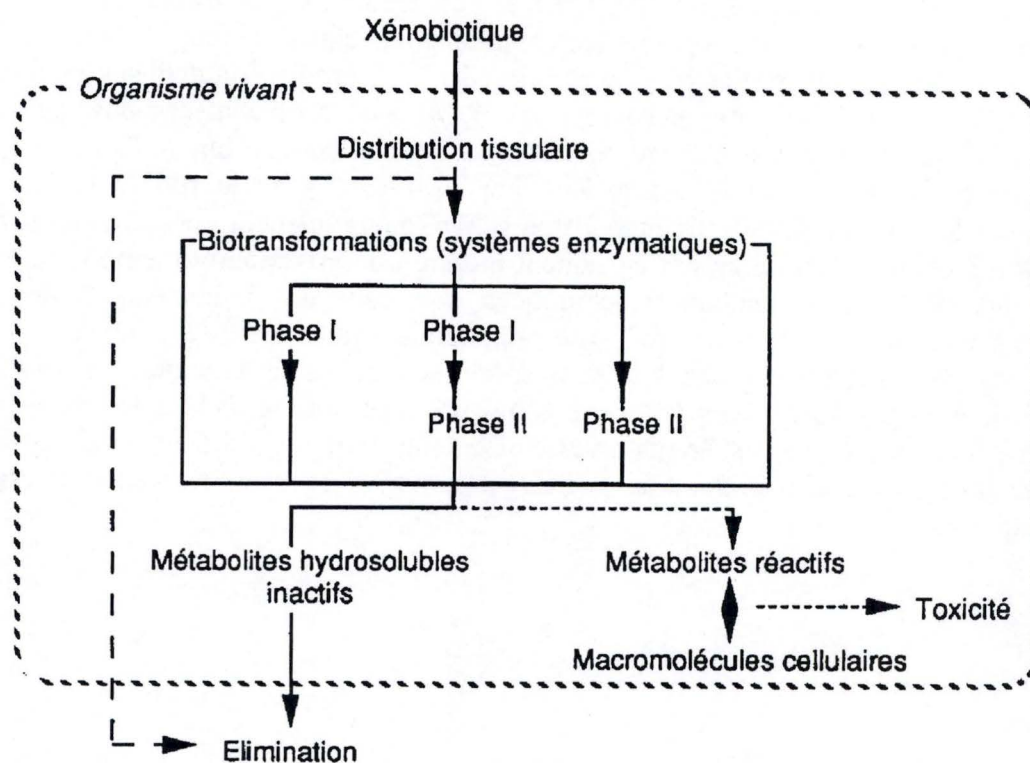


Fig. 6 : Mécanismes de détoxification des xénobiotiques (Monod, 1997).

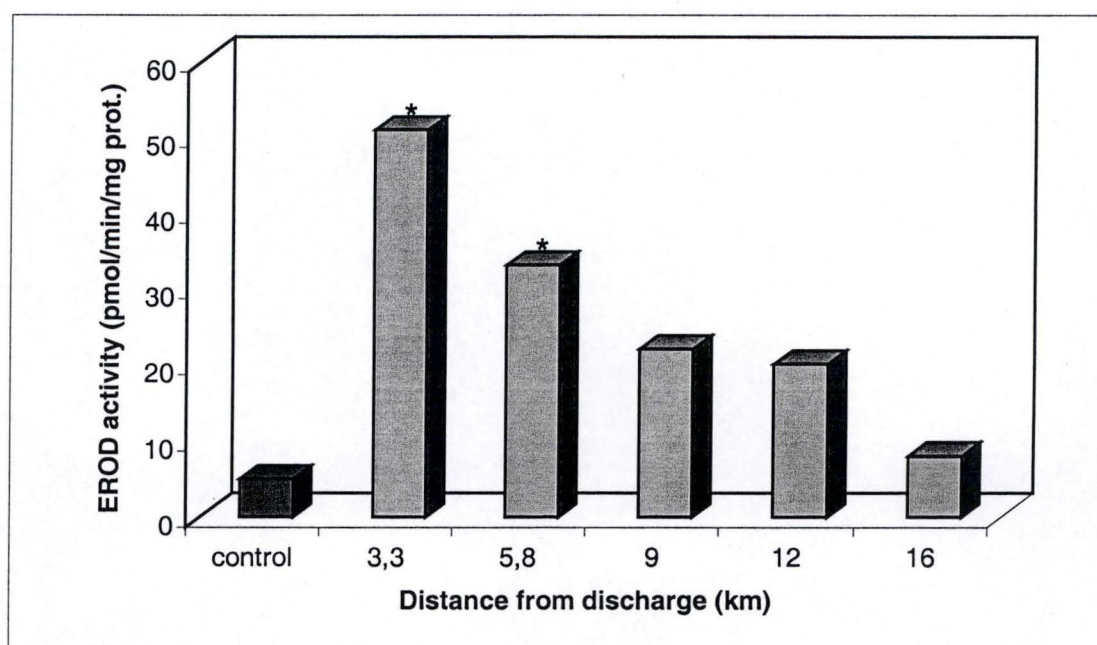


Fig. 7 : Activité EROD chez des corégones lavarets (*Coregonus lavaretus*) encagés pendant un mois à différentes distances des rejets d'une usine papetière. \* indique une différence significative entre les sites (modifié d'après Soimasuo *et al.*, 1995).



## 2. NIVEAUX D'ORGANISATION ETUDES

### 2.1. Indicateurs biochimiques de l'exposition

#### 2.1.1. Le Cytochrome P4501A et l'activité EROD (étoxyrésorufine O-dééthylase)

Après leur pénétration dans un organisme, les polluants subissent le plus souvent des transformations métaboliques, catalysées par différents systèmes enzymatiques. De fait, beaucoup de xénobiotiques sont lipophiles et pénètrent donc dans les cellules sans difficulté ; de plus, ils tendent à s'accumuler dans les organes riches en tissus lipidiques comme le foie. Leur détoxification et leur excrétion passe donc par la transformation de ces composés lipophiles en composés plus hydrosolubles (Payne *et al.*, 1987 ; Pickering & Pottinger, 1995 ; Monod, 1997). Ces différentes réactions de biotransformation se réalisent par étapes (fig.6): la **phase I**, pendant laquelle les xénobiotiques sont oxydés et la **phase II** pendant laquelle ils sont couplés à une molécule endogène (glutathion, acide glucuronique, ...). Tout ceci aboutit à une plus grande solubilité du composé et facilite son excrétion via l'urine ou la bile (Pickering & Pottinger, 1995 ; Monod, 1997).

Le cytochrome P4501A est un système multi-enzymes (monooxygénases) formant un dispositif de transfert d'électrons conduisant à l'oxydation des xénobiotiques (Pickering & Pottinger, 1995). Il s'agit donc de la " machinerie enzymatique " impliquée dans les réactions de **phase I**. Il est caractérisé par une réponse rapide et relativement spécifique (Monod, 1997) à la présence de polluants particuliers : les HAP, PCB, et dans une moindre mesure les organochlorés et les effluents d'usine de pâte à papier (Soimasuo *et al.*, 1995 ; Van der Oost *et al.*, 1996 ; Flammarion *et al.*, 1998 ; Van der Oost *et al.*, 1998 ; Coakley *et al.*, 2001). D'autres substances sont également susceptibles d'induire les réactions de phase I ; c'est le cas des organophosphorés (Jokanovic, 2001), de certains fongicides comme le propiconazole (Egaas *et al.*, 1999), etc. Ce système s'est d'ailleurs souvent montré utile pour détecter des zones de pollutions, tenter d'en identifier les sources et mesurer l'efficacité de mesures de restauration. Son utilisation comme biomarqueur a été proposée par Payne en 1976 (Flammarion *et al.*, 1998) ; il a ensuite été très utilisé par de nombreux auteurs qui ont décrit des inductions du cytochrome P4501A chez plusieurs espèces de poissons d'eau douce (Hugla *et al.*, 1995 ; Otto *et al.*, 1996 ; Van der Oost *et al.*, 1998 ; Aaltonen *et al.*, 2000 ; Coakley *et al.*, 2001) et marins (Burgeot & Galgani, 1998 ; Michel *et al.*, 1998 ; Ventura *et al.*, 2002) en relation avec divers types de pollutions.

Plusieurs méthodes de mesure de l'induction du cytochrome P4501A sont possibles (activités EROD, pentoxyrésorufine O-dealkylase (PROD), étoxycoumarine O-dééthylase (ECOD), aryl-hydrocarbon hydroxylase (AHH), ...) mais d'entre toutes, l'activité EROD apparaît comme la plus sensible et la plus aisée à mesurer (Van der Oost *et al.*, 1996 ; Flammarion *et al.*, 1998). Cependant, l'activité EROD est extrêmement variable d'un tissu à l'autre. Etant donné le niveau élevé des activités de biotransformation dans le foie, c'est en toute logique que la plupart des études ont utilisé les dosages hépatiques.

Si dans les cas de nette contamination des sites altérés, l'augmentation de l'induction EROD est souvent suffisante pour décrire les situations de pollution, dans d'autres cas moins contrastés, l'EROD sera incapable de discriminer les sites sains des sites altérés. Ainsi, certains auteurs comme Hugla *et al.* (1995), Soimasuo *et al.* (1995) (fig.7) ou Van der Oost *et*



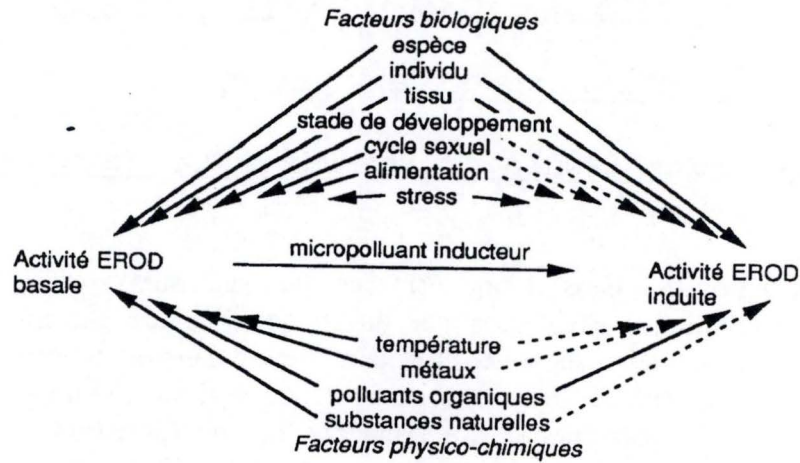


Fig. 8 : Facteurs modulateurs du niveau basal et du taux d'induction de l'activité EROD. Trait plein : démontré. Trait pointillé : probable (Monod, 1997).

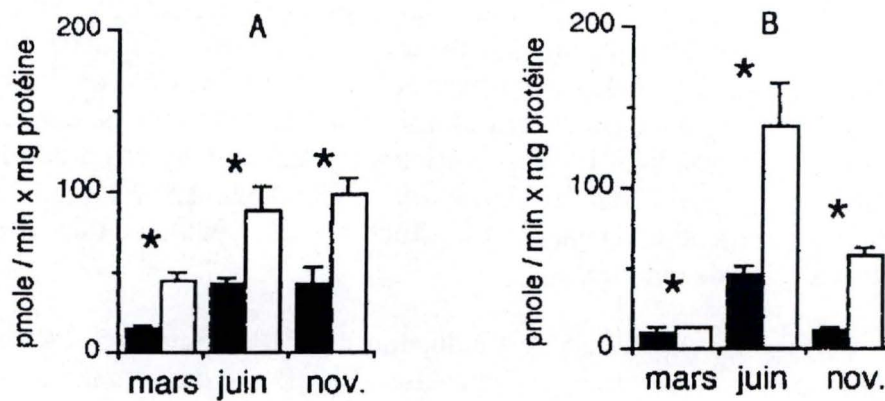


Fig. 9 : Effet du sexe sur l'activité EROD hépatique chez des hotus (*Chondrostoma nasus*) exposés à des rejets d'une usine de recyclage des PCB (blanc) et dans des sites de référence (noir). Le graphique A représente les individus mâles ; le graphique B les individus femelles. \* indique une différence significative entre les valeurs. (d'après Masfaraud *et al.*, 1990 cité dans Flammarion *et al.*, 1998).



*al.* (1996) ont pu mettre en évidence des relations entre la réponse de l'activité EROD et le niveau de contamination de l'environnement et/ou des organismes. Cependant, dans l'étude de Behrens & Segner (2001), il semble que le niveau de contamination mesuré dans les rivières et dans les poissons soit insuffisant pour induire une activité EROD significative. D'autres études ont par contre été incapables de montrer une relation claire entre l'EROD et le niveau de pollution du milieu (Van der Oost *et al.*, 1996).

Bien que la pollution soit un facteur expliquant en grande partie la variation d'activité EROD chez des organismes sentinelles, de nombreux autres facteurs, qualifiés "de confusion" (Amiard *et al.*, 1998), comme l'espèce, le sexe ou la saison, peuvent également être responsables d'une variabilité de la réponse EROD. Ils doivent donc être pris en compte lors de l'interprétation des résultats (fig.8). Ces facteurs, biotiques (espèce, sexe, ...) ou abiotiques (température, saison, ...) sont donc susceptibles de moduler les niveaux de cytochrome P4501A et/ou les activités enzymatiques associées.

Flammarion *et al.* (1998) ont recensé - en se basant sur plusieurs études antérieures - les principaux facteurs de confusion interagissant avec les xénobiotiques sur l'activité EROD.

Premièrement, compte tenu de la fragilité des systèmes enzymatiques, **les conditions de mesure** ont été identifiées comme facteur de confusion. Monod *et al.* (cité dans Flammarion *et al.*, 1998) ont ainsi remarqué qu'un temps le plus court possible doit séparer le moment de la capture de celui où le poisson est sacrifié pour le prélèvement, les conditions de stress pouvant conduire à une perte importante de l'activité enzymatique. La bonne conservation des prélèvements est également essentielle, la plupart des auteurs utilisant l'azote liquide.

Ensuite, **le facteur spécifique** semble jouer un rôle important dans la variation de l'EROD (Payne *et al.*, 1987 ; Behrens & Segner, 2001). Cette variabilité liée à l'espèce est bien établie dans les études *in vitro*. Dans le milieu naturel, le mode de vie (pélagique ou benthique) des poissons (généralement caractéristique de l'espèce) pourrait être important à considérer ; Vindimian *et al.* (1991) ont d'ailleurs noté une induction plus importante de l'EROD chez des barbeaux (*Barbus barbus*), poissons benthiques vivant en contact permanent avec un substrat et une alimentation plus contaminée, que chez des hotus (*Chondrostoma nasus*) et chevaines (*Leuciscus cephalus*), poissons au mode de vie pélagique, prélevés dans une même station. D'autre part, dans leur étude pour le projet VALIMAR visant à valider l'utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement, Behrens et Segner (2001) ont clairement montré une différence d'induction de l'EROD entre les truites fario (*Salmo trutta fario*) et les loches franches (*Nemacheilus barbatulus*) prélevées dans un même site. Schlenk *et al.* (1996) remarquaient également des différences d'induction du cytochrome P450 entre espèces prélevées dans un même site.

**Le sexe des individus et la saison** ont également une importance dans la variabilité de l'activité EROD (Payne *et al.*, 1987 ; Flammarion *et al.*, 1998), les individus mâles présentant une activité EROD supérieure à celle des femelles, avec un facteur compris entre 1 et 2 selon la saison et l'espèce (Vindimian *et al.*, 1991; Aaltonen *et al.*, 2001). Ainsi, une étude menée sur des hotus capturés en amont et en aval d'une usine d'élimination des PCB durant l'année 1988 (Masfaraud *et al.*, 1990, cité dans Flammarion *et al.*, 1998) a clairement démontré l'effet du sexe au niveau de l'induction EROD (fig.9). Les auteurs sont arrivés à la conclusion que la comparaison des différentes stations nécessitait que soient comparés des individus de même sexe. D'autre part, des études plus anciennes (Payne *et al.*, 1987) ont montré que l'induction



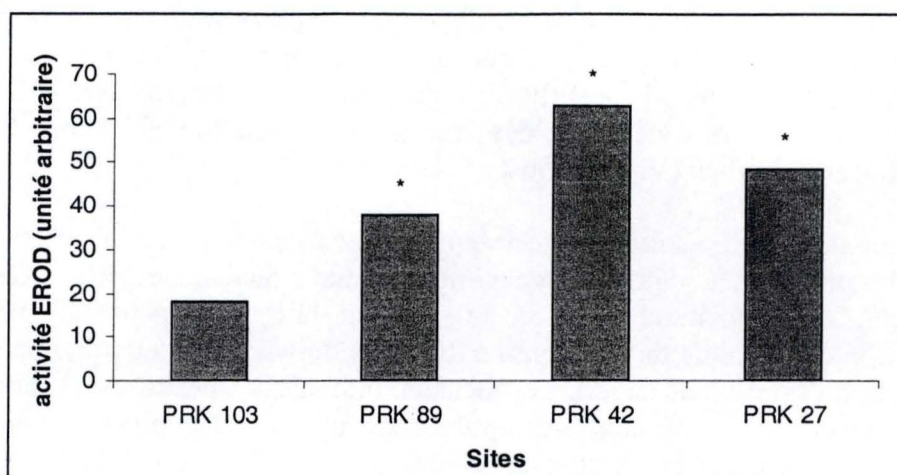


Fig. 10 : Activité EROD chez des redbreast sunfish (*Lepomis auritus*) capturés en amont (PKR 103) et en aval à différentes distances de rejets d'usines papetières. \* indique une différence significative par rapport au site PRK103 (modifié d'après Adams *et al.*, 1996).

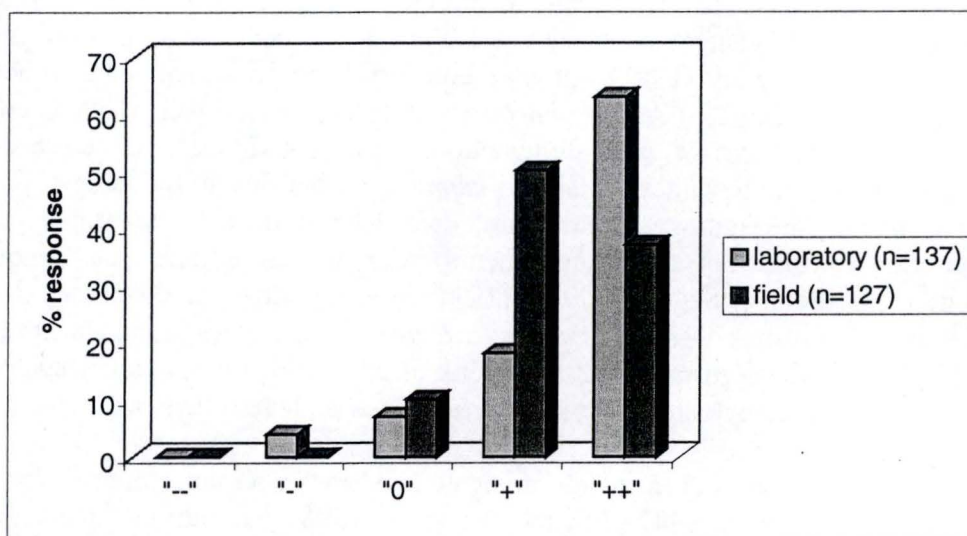


Fig. 11 : Fréquence des réponses EROD observées dans différentes études. --, forte diminution (<20% du contrôle); -, diminution; =, pas de différence significative; +, induction; ++, forte induction (> 500% du contrôle) (modifié d'après van der Oost *et al.*, 2003).



était moins sensible en période de maturation sexuelle et de reproduction. Janz *et al.* (1997) suggéraient d'ailleurs une influence des hormones sexuelles sans toutefois en préciser les mécanismes précis. L'influence des stéroïdes sexuels sera approfondie ultérieurement. La période de l'année durant laquelle se déroule la maturation diffère selon l'espèce et donc l'effet du sexe de l'activité EROD apparaît également à des périodes différentes selon l'espèce. Enfin, d'autres études ont démontré que les individus juvéniles présentaient des niveaux EROD similaires quel que soit le sexe ; ainsi, certains auteurs suggéraient de mesurer l'activité monooxygénase sur les juvéniles pour s'affranchir de cet effet du sexe (Flammarion *et al.*, 1998). Cependant, ceci est relativement difficile à effectuer en eau douce où les stades jeunes sont parfois difficilement accessibles.

**La température de l'eau** est également mentionnée par certains auteurs comme facteur de confusion potentiel (Andersson & Koivusaari, 1985). Cependant, son influence est difficile à visualiser étant donné que la température influe grandement sur les processus de maturation sexuelle (Flammarion *et al.*, 1998). Bien que son influence sur la cinétique d'induction de l'EROD ait été montrée en laboratoire, les poissons acclimatés aux températures les plus élevées montrant une induction plus forte et plus rapide de l'EROD (Andersson & Koivusaari, 1985), la température ne semble pas avoir d'effet sur l'induction de l'EROD *in vivo* (Vindimian *et al.* 1991), ce qui conforte l'influence de la saison en liaison avec la maturation sexuelle plutôt qu'avec la température.

**L'alimentation** semble aussi jouer un rôle sur les activités monooxygénases dans la mesure où il s'agit d'une voie importante de contamination des organismes sentinelles (Flammarion *et al.*, 1998).

Enfin, certaines études ont mis en évidence l'existence de **phénomènes inhibiteurs** des activités monooxygénases en présence de fortes doses de polluants inducteurs ou d'inhibiteurs organiques ou métalliques (Schlenk *et al.*, 1996 ; Monod, 1997; Coakley *et al.*, 2001). L'activité EROD de poissons pêchés dans des stations proches des rejets peut ainsi être plus faible que celle mesurée sur des poissons vivant plus loin en aval (Adams *et al.*, 1996 ; fig.10). Schlenk *et al.* (1996) ont expliqué que la plus faible induction du cytochrome P450 observée chez les individus en mauvaise santé (Fish Health Index le plus bas) était due à l'action de protéines de stress (HSP30) - particulièrement induites chez les individus malades - impliquées dans le catabolisme des protéines à hème du cytochrome P450.

Etant donné le nombre important de facteurs susceptibles de moduler l'activité EROD, la définition de valeurs absolues de référence *in vivo* semble impossible ; seule une démarche d'appréciation relative semble envisageable. Ainsi, l'approche la plus rigoureuse consisterait en une comparaison entre des individus de même espèce, de même sexe, préférentiellement mâles (moins variables que les femelles) et d'âge équivalent, situés au même stade de maturation sexuelle et capturés en différents sites de l'écosystème étudié. Dans ce cas, un ou plusieurs sites seront désignés comme référence relative (Monod, 1997).

Le développement d'un biomarqueur et son utilisation *in situ* requièrent une mesure simple et réalisable sur de nombreux individus, avec une réponse dépendant seulement de la dose et du temps, qui permette une quantification de l'exposition ou de l'effet à partir de la mesure du biomarqueur ; celle-ci présentant une bonne sensibilité et une variabilité liée aux facteurs non toxiques bien comprise et dans des limites acceptables, enfin, une signification biologique doit exister en terme de taille, de condition de population, ... (Flammarion *et al.*, 1998). L'induction du cytochrome P4501A répond en grande partie à ces critères, il a



Tab.6: Activité EROD dans différentes études visant à valider son utilisation en tant que biomarqueur. +, induction significative ; 0, pas de différence significative avec les contrôles ; -, diminution significative.

Site	Contamination	Espèce	Induction	Auteurs
Rivières Krähenbach et Körsch (Allemagne)	Pesticides, HAP, PCB et métaux	Truite fario ( <i>Salmo trutta</i> )	+	Behrens & Segner, 2001
Rivières Krähenbach et Körsch (Allemagne)	Pesticides, HAP, PCB et métaux	Loche franche ( <i>Noemacheilus barbatulus</i> )	0	Behrens & Segner, 2001
Meuse (Belgique)	PCB	Barbeau ( <i>Barbus barbus</i> )	+	Hugla <i>et al.</i> , 1995
Lac Saimaa (Finlande)	effluents d'usines papetières	Corégone lavaret ( <i>Coregonus lavaretus</i> )	+	Soimasuo <i>et al.</i> , 1995
Sites divers (Pays-Bas)	PCB, dioxines, HAP et pesticides	Anguille ( <i>Anguilla anguilla</i> )	+	Van der Oost <i>et al.</i> , 1996
Outer IJ et Volgermeerpolder (Pays-Bas)	PCB et organochlorés	Carpe ( <i>Cyprinus carpio</i> )	+	Van der Oost <i>et al.</i> , 1998
Pigeon river (USA, Tennessee)	effluents d'usines papetières	Redbreast sunfish ( <i>Lepomis auritus</i> )	+	Adams <i>et al.</i> , 1992
East Fork Poplar Creek (USA, Tennessee)	PCB	Redbreast sunfish ( <i>Lepomis auritus</i> )	+	Adams <i>et al.</i> , 1992
Pigeon river (USA, Tennessee)	effluents d'usines papetières	Redbreast sunfish ( <i>Lepomis auritus</i> )	+ avec inhibition à la plus forte concentration	Adams <i>et al.</i> , 1996
St François River (Quebec)	effluents d'usines papetières	White sucker ( <i>Catostomus commersoni</i> )	variable: +, 0, -	Kovacs <i>et al.</i> , 2002
<i>in vitro</i>	effluents d'usines papetières	Gardon ( <i>Rutilus rutilus</i> )	mâles: + femelles: 0	Aaltonen <i>et al.</i> , 2000

Tab.7: Activité GST dans différentes études visant à valider son utilisation en tant que biomarqueur. +, induction significative ; 0, pas de différence significative avec les contrôles ; -, diminution significative.

Site	Contamination	Espèce	Induction	Auteurs
Massena (USA, New York)	PCB	Truite arc-en-ciel ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	-	Otto <i>et al.</i> , 1996
Baies de la côte de Rio de Janeiro (Brésil)	polluants domestiques et industriels	Gorets corocoro ( <i>Orthopristis ruber</i> )	-	Ventura <i>et al.</i> , 2002
Elizabeth River (USA)	creosote	Fondule ( <i>Fundulus heteroclitus</i> )	+	Armknrecht <i>et al.</i> , 1998
<i>in vitro</i>	effluents d'usines papetières	<i>Channa punctatus</i> , Bloch	+	Ahmad <i>et al.</i> , 2000
<i>in vitro</i>	Métaux lourds	Moule ( <i>Mytilus galliprovincialis</i> )	+	Canesi <i>et al.</i> , 1999
<i>in vitro</i>	toxines de dinoflagellés	Saumon atlantique ( <i>Salmo salar</i> )	+	Gubbins <i>et al.</i> , 2000
<i>in vitro</i>	Propiconazole	Truite fario ( <i>Salmo trutta</i> )	+ mais inhibition pour les doses > 100 ppb.	Egaas <i>et al.</i> , 1999
Outer IJ et Volgermeerpolder (Pays-Bas)	PCB et organochlorés	Carpe ( <i>Cyprinus carpio</i> )	+	Van der Oost <i>et al.</i> , 1998
Lac Saimaa (Finlande)	effluents d'usines papetières	Corégone lavaret ( <i>Coregonus lavaretus</i> )	0	Soimasuo <i>et al.</i> , 1995
Rivières Krähenbach et Körsch (Allemagne)	Pesticides, HAP, PCB et métaux	Truite fario ( <i>Salmo trutta</i> )	0	Behrens & Segner, 2001
Rivières Krähenbach et Körsch (Allemagne)	Pesticides, HAP, PCB et métaux	Loche franche ( <i>Noemacheilus barbatulus</i> )	0	Behrens & Segner, 2001
<i>in vitro</i>	microcystine LR	Carassin doré ( <i>Carassius auratus</i> )	0	Malbrouck <i>et al.</i> , 2003



d'ailleurs connu depuis plus de 10 ans une utilisation grandissante dans le suivi de la qualité des milieux et bénéficie dès lors de bonnes connaissances quant aux mécanismes mis en place et des facteurs intervenant dans sa variation (Flammarion *et al.*, 1998). De plus, son induction a été clairement observée dans différentes études, en laboratoire comme sur le terrain (fig.11 et tab.6). Ceci justifie en grande partie le choix de l'activité EROD en tant que biomarqueur lors de la réalisation de cette étude.

### **2.1.2. L'activité GST (Glutathione S-transferase)**

Comme nous l'avons vu précédemment, les xénobiotiques assimilés par un organisme peuvent être détoxifiés selon deux voies : la **phase I**, faisant intervenir les enzymes du cytochrome P450, et la **phase II** au cours de laquelle les polluants sont couplés à une molécule endogène telle le glutathion réduit (GSH) ou l'acide glucuronique, ce qui facilite leur excrétion en milieu aqueux (fig.6). La réaction de conjugaison du composé toxique électrophile au GSH est catalysée par une série d'enzymes appartenant à une famille multigénique particulière : les GST (glutathione S-transferases) (van Bladeren, 2000 ; Cnubben *et al.*, 2001).

Ce sont des enzymes solubles présentes chez presque tous les organismes (van Bladeren, 2000). Elles sont majoritairement présentes dans la fraction cytosolique de différents types cellulaires (Pérez-López *et al.*, 2000). Ces deux propriétés leur confèrent le statut de protéines ubiquistes (Martinez-Lara *et al.*, 1996). Elles sont toutefois plus abondantes dans le tissu hépatique (van der Oost *et al.*, 2003). Les GST sont des protéines dimériques, d'environ 25 kDa / sous-unité. Chacune des sous-unités possède un site de liaison au GSH (site G) et un site hydrophobe adjacent pour lier le substrat électrophile (Cnubben *et al.*, 2001). Il existe plusieurs isoformes de l'enzyme GST répartis en 6 classes :  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\sigma$  et  $\zeta$  (van Bladeren, 2000) selon leur séquence protéique, leur spécificité vis-à-vis du substrat ou encore leurs propriétés immunologiques (Armknicht *et al.*, 1998 ; Pérez-López *et al.*, 2000). Ce nombre élevé d'isoformes permet à la GST de répondre à un large éventail de substrats : composés cancérogènes, polluants environnementaux, drogues et autres xénobiotiques mais aussi molécules endogènes telles que les prostaglandines ou les stéroïdes (van Bladeren, 2000 ; Cnubben *et al.*, 2001). En plus de la fonction de couplage moléculaire, la GST jouerait un rôle de protection en cas de stress oxydant (Ahmad *et al.*, 2000 ; Stephensen *et al.*, 2002).

Plusieurs auteurs ont étudié la réponse de la GST lors de l'exposition à des xénobiotiques, aussi bien *in vitro* que *in vivo* (tab.7).

En laboratoire, Canesi *et al.* (1999) ont remarqué une induction significative de la GST chez des moules de l'Atlantique exposées à différents métaux lourds. Gubbins *et al.* (2000) observaient également une activité GST plus importante chez des saumons atlantiques (*Salmo salar*) contaminés par des toxines paralysantes de certains dinoflagellés. Une étude norvégienne (Egaas *et al.*, 1999) a pu mettre en évidence une induction de la GST chez des truites fario contaminées au propiconazole (fongicide organochloré). Cependant, les auteurs remarquaient une diminution dans l'expression de la GST lorsque les poissons étaient intoxiqués à des doses importantes (> 100 ppb). Enfin, Martinez-Lara *et al.* (1996) ont noté une augmentation de l'activité GST chez des daurades royales (*Sparus aurata*) exposées à différents polluants tels que les organochlorés, les organophosphorés ou le cuivre.

Des études sur des poissons encagés ont montré des résultats variables. En effet, van der Oost *et al.* (1998) ont pu observer une augmentation de l'activité GST chez des carpes (*Cyprinus carpio*) exposées à des niveaux élevés de pollution pendant une période prolongée.



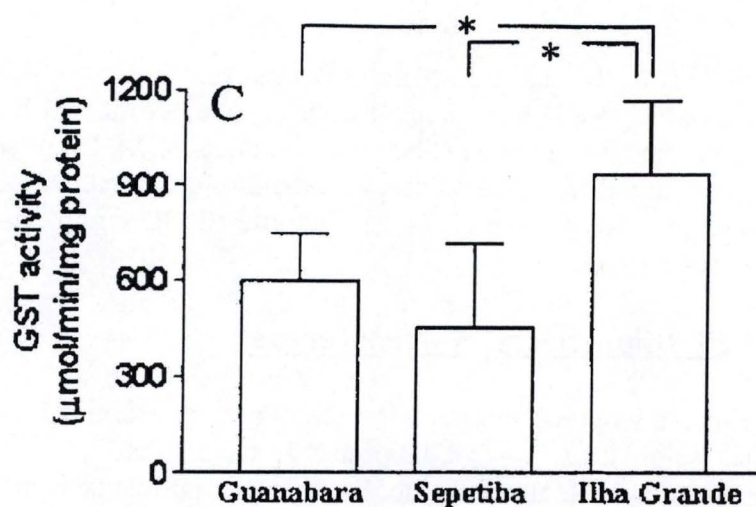


Fig. 12 : Activité GST chez des gorets corocoro (*Orthopristis ruber*) capturés dans les sites contaminés de Guanabara et Sepetiba et dans le site de référence de Ilha Grande. \* indique une différence significative entre les sites (Ventura *et al.*, 2002).

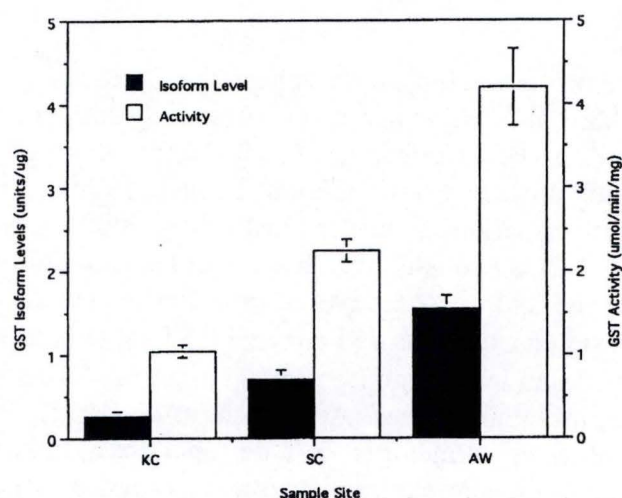


Fig. 13 : Comparaison de l'activité GST chez des fondules (*Fundulus heteroclitus*) prélevés dans trois sites. KC = site de référence ; SC = site modérément contaminé au creosote ; AW = site très contaminé au creosote (Armknrecht *et al.*, 1998).

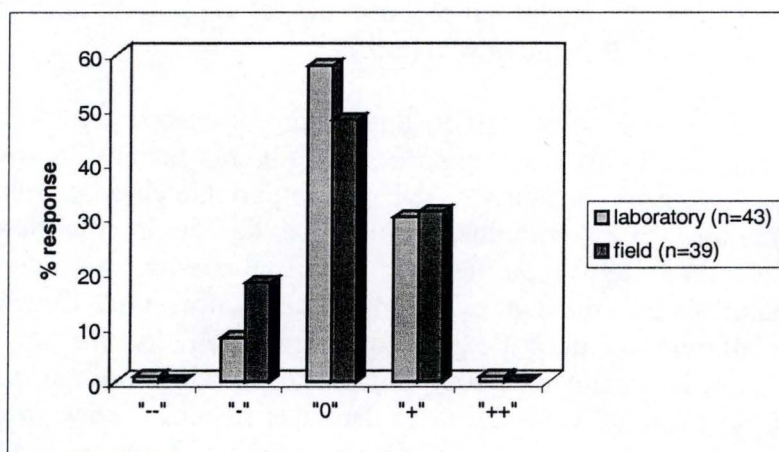


Fig. 14 : Fréquence des réponses GST observées dans différentes études. --, forte diminution (<20% du contrôle) ; -, diminution ; =, pas de différence significative ; +, induction ; ++, forte induction (> 500% du contrôle) (modifié d'après van der Oost *et al.*, 2003).



D'autre part, Soimasuo *et al.* (1995) n'ont pas pu mettre en évidence de différence significative entre les niveaux de GST de corégones lavaret exposés aux effluents d'usines de pâte à papier et les individus contrôles. Enfin, Otto *et al.* (1996) ont remarqué une diminution de la GST chez des truites arc-en-ciel exposées à des sédiments contaminés aux PCB.

Sur le terrain, van der Oost *et al.* (1996) ont pu mettre en évidence une induction de la GST chez des anguilles (*Anguilla anguilla*) vivant sur deux des six sites étudiés. Dans leur étude pour le projet VALIMAR, Behrens et Segner (2001) n'ont pas pu discriminer les sites étudiés par les activités GST mesurées chez la truite fario et la loche franche. Lors de cette même étude, aucune différence de l'activité GST n'a pu être observée entre les poissons sauvages et les contrôles en laboratoire. Ventura *et al.* (2002) ont même noté des activités GST plus faibles chez des gorets corocoro (*Orthopristis ruber*) exposés à des contaminations industrielles que chez les individus du site de référence (fig.12). Enfin, Armknecht *et al.* (1998) ont remarqué une induction importante de la GST dans des populations de fondules vivant sur des sites contaminés par rapport à celles vivant sur le site de référence (fig.13).

Les réponses de la GST à une contamination du milieu sont donc relativement moins nettes et moins sensibles que les réponses de phase I (van der Oost *et al.*, 1996). En effet, même si certaines études mettent en évidence une augmentation (voire plus rarement une diminution) de l'activité GST suite à une contamination, la plupart d'entre elles ne montrent aucune différence entre les sites pollués et les situations contrôles (fig.14). Ceci pourrait être dû aux différents isoformes de la GST. En effet, ceux-ci étant classés selon leur spécificité vis-à-vis du substrat, il est fort probable qu'un xénobiotique n'induit de variation que chez une seule classe d'isoforme. La mesure de l'activité GST totale (soit de tous les isoformes), beaucoup plus constante (Martinez-Lara *et al.*, 1996), masquerait alors l'information donnée par les variations de niveau d'une seule classe de GST (Pérez-López *et al.*, 2000). Cependant, il faut signaler que la détection des différents isoformes de la GST fait appel à des techniques perfectionnées et lourdes à mettre en œuvre (Martinez-Lara *et al.*, 1996).

Néanmoins, la GST demeure un biomarqueur intéressant à utiliser dans les études de biomonitoring car elle constitue un mécanisme très important dans les processus de détoxification des xénobiotiques (van der Oost *et al.*, 2003). Il s'agit de plus d'un marqueur biochimique de phase II, complémentaire des biomarqueurs de phase I largement utilisés en écotoxicologie. Ceci justifie le choix de ce paramètre en tant qu'indicateur de l'exposition aux polluants.

### **2.1.3. La protéine de stress HSP70 (heat-shock protein 70)**

Initialement découvertes en réponse à un choc thermique, les protéines de stress (Heat-Shock Proteins) sont en fait induites par un très large éventail de stress chimiques, physiques et biologiques tels que la salinité, l'anoxie, une infection parasitaire, un stress oxydant, les métaux lourds, les rayonnements ultraviolets, une large gamme de xénobiotiques, etc. (Sanders, 1993 ; Feder & Hofmann, 1999 ; Janz *et al.*, 2001 ; Basu *et al.*, 2002).

Les HSP sont des protéines présentes chez tous les organismes examinés à ce jour et dans tous les types cellulaires (Dhainaut *et al.*, 1997). Elles sont remarquablement conservées (Feder & Hofmann, 1999), tout ceci leur donne un statut de protéine ubiquiste (Ait-Aissa, 2000).



Tab. 8 : Différentes familles de HSP et leurs principales fonctions (Ait-Aissa, 2000).

Familles de HSP	Conditions physiologiques normales (rôle constitutif)	Cellules sous conditions de stress (rôle après induction)
HSP90	Formation de complexes protéiques avec plusieurs enzymes, récepteurs (e.g. hormonaux, Ah), composants du cytosquelette.	Synthèse induite par le stress. Seraït impliquée dans le développement de thermotolérance/résistance au stress.
HSP70	Régule l'homéostasie protéique en intervenant dans la mise en forme, l'assemblage, le transport intracellulaire, ou encore la réparation des protéines. Rôle de chaperon moléculaire qui prévient et protège de la dénaturation protéique. Impliquée dans la réponse immunitaire (transport de l'antigène), phagocytose.  Autorégulation de son expression génique par interactions avec les facteurs de transcription (HSF).	Synthèse induite par le stress. Protection contre toute forme de protéotoxicité: - formation de complexes protéiques qui évitent la dénaturation (notamment pour des molécules vitales pour la cellule) - empêche la formation d'agrégats insolubles (létaux pour la cellule) - destruction des agrégats formés, renaturation des protéines endommagées - transport des protéines très endommagées vers la dégradation lysosomale.
HSP60 (chaperonine)	Localisation mitochondriale ou chloroplastique chez les eucaryotes. Chaperon moléculaire (chaperonine): mise en forme et assemblage des protéines; prévention de l'agrégation des peptides naissants.	Synthèse induite par le stress. Renaturation des protéines altérées, protection contre la dénaturation et l'agrégation; mais incapable comme HSP70 de casser les agrégats formés.
HSP16-30	Spécifiques du tissu et de l'espèce qui les contient. Rôle dans la réponse aux hormones stéroïdiennes. Chaperon moléculaire potentiel. Impliquées dans le développement des organismes.	Synthèse induite par le stress. Impliquées dans la thermotolérance et la résistance au stress oxydant. Induites dans certaines cellules cancéreuses et dans la réponse cellulaire aux composés antitumoraux. Interactions avec les filaments d'actine: stabilise le cytosquelette après traitement toxique.

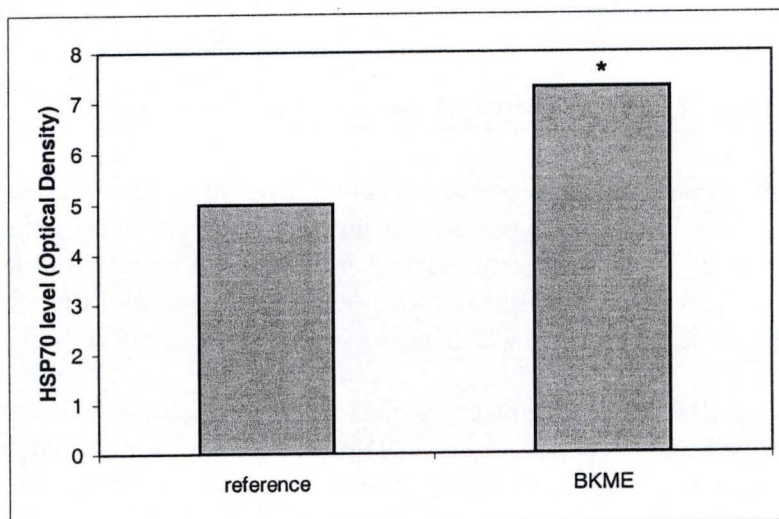


Fig. 15 : Niveaux de HSP70 ovariennes chez des white sucker (*Catostomus commersoni*) capturés en aval de rejets d'une usine papetière (BKME, Bleached Kraft Mill Effluents) et dans un site de référence. \* indique une différence significative entre les sites. (modifié d'après Janz *et al.*, 1997).



La réponse au stress de ces HSP se traduit par la réparation et/ou l'élimination de protéines intracellulaires endommagées par le facteur de stress. Les HSP agissent en fait comme des chaperons moléculaires (Feder & Hofmann, 1999 ; Janz *et al.*, 2001 ; Weber *et al.*, 2002), c'est-à-dire qu'elles sont capables de se lier aux autres protéines intracellulaires pour assurer le maintien de leur forme native.

Il existe plusieurs familles de HSP classées en fonction de leur poids moléculaire. On distingue en général 4 grandes familles d'environ 90, 70, 60 et 25 kiloDaltons (kDa), respectivement nommées HSP90, HSP70, HSP60 et sHSPs (small HSPs, Ait-Aissa, 2000) ou LMW HSPs (Low Molecular Weight, Sanders, 1993). D'entre elles, la HSP70 est la plus conservée, la plus abondante et la plus étudiée (Janz *et al.*, 2001). Cette famille multigénique regroupe au moins 21 protéines (Dhainaut *et al.*, 1997).

Il est important de mentionner qu'il existe, comme chez d'autres HSP, 2 isoformes de HSP70 (Dhainaut *et al.*, 1997 ; Ait-Aissa, 2000): d'une part, les **HSP constitutives** et d'autre part les **HSP inductibles** (Weber *et al.*, 2002). Les HSP constitutives sont présentes même en conditions non stressantes. Elles sont impliquées dans la synthèse, le transport et la mise en forme de la structure tertiaire des protéines non natives, ainsi que dans l'homéostasie et le maintien de l'intégrité cellulaire (Sanders, 1993 ; Feder & Hofmann, 1999 ; Ait-Aissa, 2000). Les HSP inductibles sont quant à elles synthétisées sous conditions stressantes par la cellule et capables, vu leurs propriétés de chaperons moléculaires, d'empêcher la dénaturation des protéines auxquelles elles se lient, de provoquer la réparation ou la destruction des protéines intracellulaires altérées et d'empêcher l'accumulation de protéines aberrantes et d'agrégats insolubles toxiques. Elles contribuent ainsi à la restauration progressive des fonctions normales de la cellule (Sanders, 1993 ; Feder & Hofmann, 1999 ; Ait-Aissa, 2000). Les principales fonctions des protéines de stress sont présentées dans le tableau 8.

L'induction des HSP peut se produire suite à un choc thermique (elles sont également impliquées dans le phénomène de thermotolérance (Basu *et al.*, 2002)), mais aussi lors de l'exposition à une large gamme de stress différents (voire plus haut). Elles sont en général induites lors d'altérations de protéines intracellulaires (Sanders, 1993). Parmi les polluants susceptibles d'induire la synthèse des HSP, on compte les métaux, les HAP et PCB, les organochlorés et d'autres composés organiques (Sanders, 1993).

L'utilisation des HSP, et en particulier de la HSP70, comme biomarqueur d'effet pour le monitoring des pollutions suppose qu'elles répondent à plusieurs critères de base (Stegeman *et al.* cité dans Dhainaut *et al.*, 1997 ).

**Universalité de la réponse** : il est permis de penser que la HSP70 peut être induite par la plupart des contaminants majeurs de l'environnement (Weber *et al.*, 2002). Le caractère quasi universel et ubiquiste de ces protéines (Dhainaut *et al.*, 1997 ; Ait-Aissa, 2000) vient confirmer cette universalité : elles sont en effet détectées chez un grand nombre d'organismes et présentes dans tous les types tissulaires (Ait-Aissa, 2000).

**Influence réduite des facteurs de confusion et connaissance des effets conjugués des agents stresseurs** : La température est le facteur environnemental le plus susceptible de moduler la réponse des HSP70 (Sanders, 1993 ; Feder et Hofmann, 1999). Köhler *et al.* (2001), dans leur étude pour le projet VALIMAR, ont d'ailleurs montré que la réponse HSP70 chez la truite fario et la loche franche dépendait fortement de la température et qu'il existait une température " optimale " pour l'induction des HSP70. L'alimentation pourrait également



Tab.9: Induction de la HSP70 dans différentes études visant à valider son utilisation en tant que biomarqueur. +, induction significative ; 0, pas de différence significative avec les contrôles ; -, diminution significative.

Site	Contamination	Espèce	Induction	Auteurs
Brush Creek (USA, Oklahoma)	effluents de station d'épuration	Longear fish ( <i>Lepomis megalotis</i> )	0	Porter & Janz, 2003
Jackfish Bay (USA, Ontario)	effluents d'usines papetières	White sucker ( <i>Catostomus commersoni</i> )	+	Janz <i>et al.</i> , 1997
Mattagami River (USA, Ontario)	effluents d'usines papetières	White sucker ( <i>Catostomus commersoni</i> )	+ avant la mise en service d'une station d'épuration, ensuite 0.	Janz <i>et al.</i> , 2001
<i>in vitro</i>	$\beta$ -Naphthoflavone	Truite arc-en-ciel ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	+	Weber <i>et al.</i> , 2002

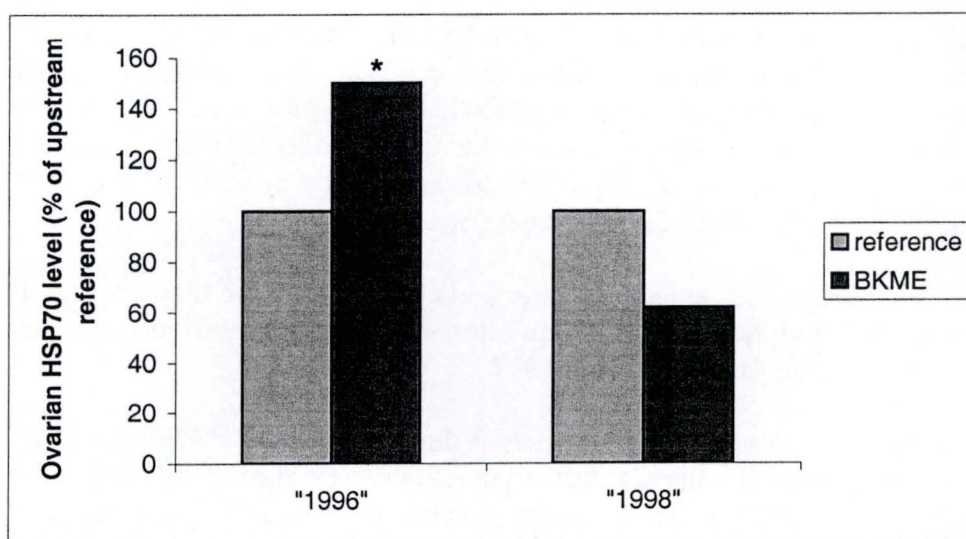


Fig. 16 : Niveaux de HSP70 ovariennes chez des white sucker (*Catostomus commersoni*) capturés en aval de rejets d'une usine papetière (BKME) et dans des sites de référence. Les poissons ont été collectés avant (1996) et après (1998) la mise en service d'une station d'épuration. \* = différence significative entre les valeurs (modifié d'après Janz *et al.*, 2001).



moduler l'induction des HSP70 (Sanders, 1993). La capture et la manipulation des organismes seraient aussi capables d'influer sur le niveau de HSP, cependant il ne semble pas que les HSP soient sensibles à ce facteur tant que la prudence est de rigueur (Sanders, 1993). Selon certains auteurs (Dhainaut *et al.*, 1997), les hormones stéroïdiennes pourraient induire certaines HSP, suggérant des variations possibles des niveaux de HSP70 en fonction du sexe, de l'âge et de l'état de maturation sexuelle (Ait-Aissa, 2000).

**La dynamique de réponse** doit répondre à une relation dose-effet, elle ne doit pas être transitoire. Or, selon Heikkila *et al.* (cité dans Dhainaut *et al.*, 1997), le taux de HSP chez des organismes exposés de façon continue à un agent stressant a tendance à décroître. Cette constatation limiterait l'intérêt de l'utilisation des HSP comme biomarqueur. Cependant, d'autres travaux (Janz *et al.*, 1997 ; Janz *et al.*, 2001) ont montré que l'induction des HSP était tout de même détectable chez des individus exposés pendant une grande partie de leur vie. L'induction des HSP répond bien à une relation dose-effet (Feder & Hofmann, 1999).

**Sensibilité** : la synthèse de protéines de stress est induite à des doses toxiques sublétales (Janz *et al.*, 1997 ; Weber *et al.*, 2002). D'après Dhainaut *et al.* (1997), cette réponse est nettement plus sensible qu'une réponse de type physiologique. Cependant, si certaines études parviennent à discriminer les sites contaminés des sites de référence par des mesures de HSP70 (Janz *et al.*, 1997 ; cf. fig.15), d'autres ne montrent aucune différence entre les niveaux de HSP70 chez des individus sains et contaminés (Weber *et al.*, 2001). Le tableau 9 reprend les résultats d'une série d'études visant à valider l'utilisation de la protéine de stress HSP70 comme biomarqueur.

En conclusion, on peut affirmer que l'induction de HSP70 est intéressante à utiliser comme biomarqueur de contamination de l'environnement. Ainsi, Janz *et al.* (2001) mettaient en évidence, par des mesures de HSP70, les effets bénéfiques d'une station d'épuration installée dans une industrie papetière (cf. fig.16). La plupart des critères requis sont rencontrés par ce biomarqueur. Cependant, certains auteurs (Sanders, 1993 ; Janz *et al.*, 2001) soulignent le manque de données concernant les HSP dans une approche environnementale. De fait, de nombreux éléments compromettent encore l'utilisation de telles protéines dans le monitoring des polluants. Vu le large éventail de facteurs de stress pouvant induire la synthèse de HSP, il est très compliqué d'attribuer un changement dans l'expression de ces protéines à un stress particulier (Feder & Hofmann, 1999). De plus, certains facteurs agissent ensemble sur le niveau de HSP, que ce soit positivement ou négativement, et rendent l'interprétation difficile (cf. étude VALIMAR, Köhler *et al.*, 2001). Des lacunes existent aussi dans la compréhension de la dynamique exacte des HSP (Dhainaut *et al.*, 1997 ; Köhler *et al.*, 2001). Enfin, vu que les HSP sont impliquées dans le fonctionnement normal des organismes, il est impératif d'acquérir une meilleure connaissance des variations du niveau de telles protéines en conditions naturelles (Dhainaut *et al.*, 1997). Néanmoins, les HSP et en particulier les HSP70 restent de bons indicateurs moléculaires de l'état de stress d'un individu. Pour cette raison, leur induction a été choisie comme biomarqueur d'effet lors de cette étude.

## **2.2. Paramètres de la reproduction**

### **2.2.1. Généralités**

La reproduction est sans aucun doute une fonction très importante puisqu'elle permet à une espèce de se maintenir, voire même de se propager (Kime, 1998). Certains xénobiotiques sont connus pour leurs effets néfastes sur la fonction reproductive de nombreux organismes



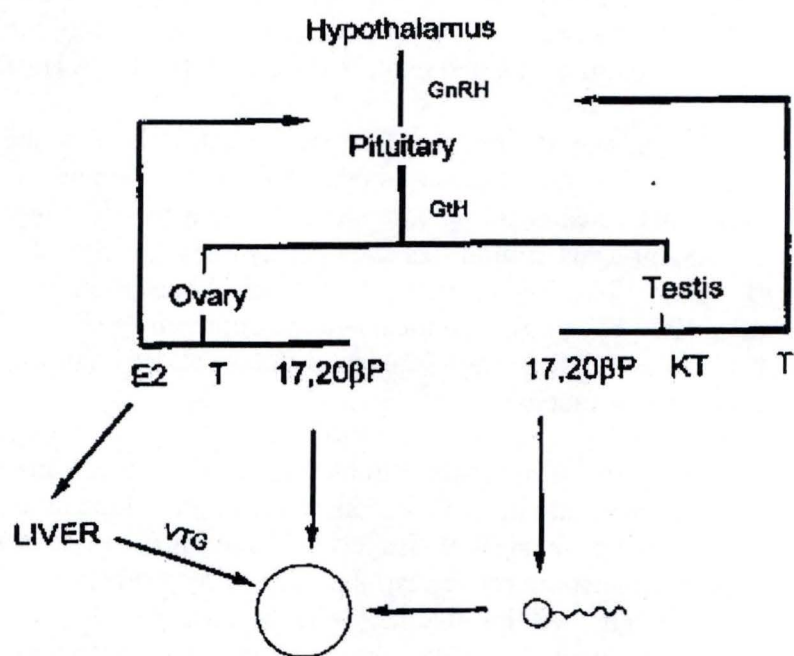


Fig. 17 : Schéma simplifié de la physiologie reproductive chez les poissons. (GnRH = gonadotrophin releasing hormone ; GtH = gonadotropine ; E2 = oestradiol ; T = testostérone ; 17,20 β P = 17,20 β - dihydroxy-4-pregnen-3-one ; KT = 11 - kétotestostérone) (Kime, 1999).

(Arukwe, 2001). Ainsi, les pesticides organochlorés, les HAP, les PCB, les métaux lourds mais aussi des mélanges complexes tels que les effluents d'usines papetières peuvent être à l'origine de perturbations du système reproducteur chez plusieurs espèces de poissons (Janz *et al.*, 1997 ; Monteiro *et al.*, 2000 ; Sepúlveda *et al.*, 2002). Selon Kime (1998), ces perturbations peuvent être de deux types: d'une part, les xénobiotiques peuvent altérer directement les organes sexuels par des dégradations de leur structure et/ou de leur fonctionnement. D'autre part, ils peuvent intervenir en tant que perturbateurs du système endocrinien, particulièrement sensible à de faibles doses de polluants.

Le système endocrinien est le dispositif de communication chimique du corps. Il comprend des glandes comme les gonades, l'hypophyse, l'hypothalamus, la thyroïde ou le foie qui sécrètent des messagers chimiques (hormones). Ces messagers vont être libérés dans le sang et véhiculés par la circulation jusqu'à un récepteur spécifique. En se liant à ce récepteur, l'hormone transmet un signal à la cellule qui pourra alors répondre aux besoins de l'organisme. Certains polluants sont capables d'interférer avec ce système de communication par différents procédés et de perturber ainsi le bon fonctionnement de l'organisme (Arukwe, 2001).

### **2.2.2. Rappel de la physiologie reproductive chez les poissons**

Le système endocrinien des poissons englobe des relations complexes entre les stimuli externes, les hormones hypothalamiques et hypophysaires, les hormones des glandes sexuelles et les processus de dégradation des hormones par le foie (fig.17). Le développement des gonades est contrôlé par un éventail de facteurs environnementaux tels que la photopériode, la température, la pluviosité, etc. Ces stimuli extérieurs vont être perçus par différents récepteurs sensoriels et les informations seront transmises par voie nerveuse à l'hypothalamus où sera produite la gonadotrophin releasing hormon (GnRH). La GnRH stimulera alors les cellules de l'hypophyse antérieure (adénohypophyse) qui produiront des gonadotropines (GTH1 et GTH2). Ces GTH vont être véhiculées via la circulation jusqu'aux gonades où elles stimuleront la production des hormones stéroïdes. L'hormone stéroïde mâle principale est la 11-kétotestostérone (11-KT) alors que le stéroïde femelle est le 17 $\beta$ -oestradiol (E2). Le rôle principal de la 11-KT est de contrôler le développement des gonades, la mise en place des caractères sexuels secondaires et le comportement reproducteur alors que celui de l'E2 est de stimuler la production par le foie d'une protéine de réserve : la vitellogénine (VTG), qui sera incorporée à l'ovocyte en développement sous l'influence de la GTH1. Notons que la testostérone (T), présente chez les mâles comme chez les femelles, ne constitue qu'un intermédiaire dans la voie de biosynthèse des stéroïdes. Chez le mâle, elle sera convertie en 11-KT et chez la femelle, elle sera transformée en E2 par un système enzymatique d'aromatisation, la 17 $\beta$ -aromatase. Une fois que les organes sexuels sont matures, les sécrétions de 11-KT et de E2 cessent au profit de la synthèse d'un nouveau stéroïde : la 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20  $\beta$ P) qui va induire la maturation finale de l'ovocyte et du sperme. Les stéroïdes, et surtout l'E2, seront dégradés par le foie. Notons enfin que les stéroïdes agissent aussi sur l'hypophyse et l'hypothalamus où ils effectuent des feedback négatifs (Kime, 1999).

### **2.2.3. Influence des polluants sur les paramètres reproducteurs**

Les effets globaux des polluants sur le système reproducteur peuvent être mis en évidence par le rapport gonadosomatique (RGS ou GSI, pour Gonado-Somatic Index), rapport entre le poids des gonades et le poids total du corps. La plupart des études montrent une



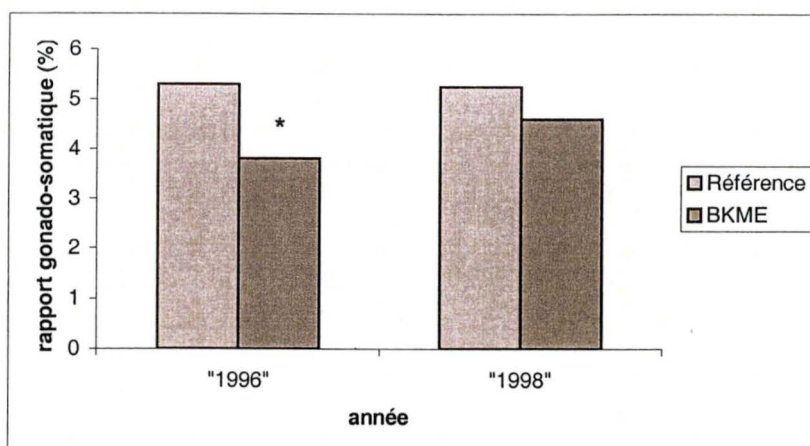


Fig.18 : Rapports gonado-somatiques chez des white sucker (*Catostomus commersoni*) capturés en aval de rejets d'une usine papetière (BKME) et dans des sites de référence. Les poissons ont été collectés avant (1996) et après (1998) la mise en service d'une station d'épuration. \* = différence significative entre les valeurs (modifié d'après Janz *et al.*, 2001).

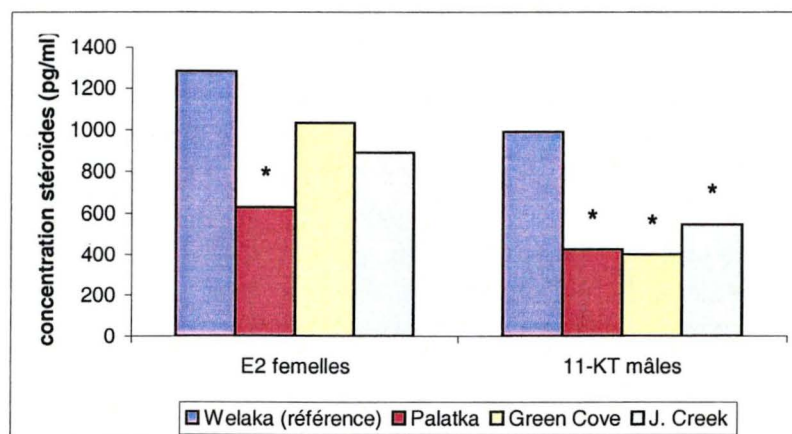


Fig.19 : Concentration en stéroïdes plasmatiques chez des achigans (*Micropterus salmoides floridanus*) pêchés sur différents sites de la rivière St. Johns durant la période de reproduction (février 1997). Welaka = site de référence ; Palatka, Green cove et J. Creek = sites subissant une contamination industrielle. (Modifié d'après Sepúlveda *et al.*, 2002).

réduction du RGS chez les individus contaminés (Kime, 1998). Janz *et al.* (2001) mettaient en évidence les effets positifs de l'installation d'une station d'épuration dans une industrie papetière par des mesures du RGS (fig.18).

Les altérations directes de la structure des gonades par les polluants peuvent être détectées par un examen histologique. Ainsi, Hugla (1994) ne remarquait aucune différence entre l'ultrastructure des testicules de barbeaux mâles contaminés aux PCB et ceux des individus témoins, par contre les ovaires de barbeaux femelles contaminés comportaient des ovocytes moins matures que ceux des barbeaux témoins. D'autres auteurs suggèrent également l'emploi d'une analyse de la qualité du sperme basée sur une méthode informatique (CASA, pour Computer Assisted Sperm Analysis ; Kime, 1999).

Les effets des xénobiotiques sur l'endocrinologie reproductive des poissons peuvent être détectés par la mesure des concentrations plasmatiques de différentes hormones sexuelles (Kime, 1998). Un dysfonctionnement de l'hypothalamus ou de l'hypophyse sera mis en évidence par une altération des niveaux de GnRH. Cependant, vu l'extrême spécificité de cette hormone, les techniques de dosages sont relativement lourdes et coûteuses (Kime, 1999). Une altération de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadien sera plutôt mise en évidence par la mesure de stéroïdes plasmatiques, dont les plus importants sont la 11-KT et l'E2. Plusieurs auteurs ont utilisé de telles mesures pour mettre en évidence des perturbations du système reproducteur chez des poissons exposés à diverses contaminations. Ainsi, McMaster *et al.* (1995) remarquaient que des white sucker femelles exposés à des rejets d'usines papetières possédaient en général des concentrations plasmatiques en E2 significativement plus faibles que les femelles contrôles. De la même manière, Sepúlveda *et al.* (2002) étudiaient les paramètres reproducteurs chez des achigans (*Micropterus salmoides floridanus*) exposés à une pollution industrielle. Des concentrations plus faibles en E2 furent trouvées chez les femelles contaminées et des niveaux plus bas de 11-KT ont été remarqués chez les mâles exposés aux polluants (fig.19). Dans leur étude sur des flets (*Platichthys flesus*) femelles exposés à une pollution par les HAP, Monteiro *et al.* (2000) ont aussi montré des taux d'E2 plus faibles que chez les individus témoins. Par contre, Janz *et al.* (1997) observaient des niveaux d'E2 plus élevés chez des white sucker exposés aux rejets d'une usine papetière que chez les poissons contrôles (fig.20). Janssen *et al.* (1997) obtenaient des résultats similaires chez des flets exposés à divers contaminants. Enfin, dans leur étude des effets du 4-nonylphénol sur les stéroïdes sexuels chez des carpes mâles, Villeneuve *et al.* (2002) ne remarquaient aucune différence entre les niveaux de stéroïdes chez les poissons contaminés et chez les individus témoins.

De telles différences peuvent parfois s'expliquer par une modification des taux de synthèse des stéroïdes. Ainsi, McMaster *et al.* (1995) expliquaient les faibles niveaux d'E2 mesurés chez les white sucker femelles par une altération de la stéroïdogenèse au niveau de la conversion de la testostérone en E2 par l'enzyme 17 $\beta$ -aromatase. Cependant, d'autres auteurs suggéraient plutôt une altération des voies de dégradation des stéroïdes ; ceux-ci étant naturellement catabolisés par les monooxygénases à cytochrome P450 du foie. Or, comme nous l'avons remarqué précédemment, une contamination environnementale est susceptible d'induire une activité élevée de ces enzymes (EROD, ...). Selon Kime (1999), une augmentation de l'activité des monooxygénases pourrait aboutir à une dégradation plus importante des stéroïdes, mais pourrait également conduire à une diminution de leur catabolisme si les polluants sont utilisés préférentiellement comme substrat. Ainsi, Janssen *et al.* (1997) justifiaient les niveaux élevés de stéroïdes mesurés sur des flets femelles vivant sur



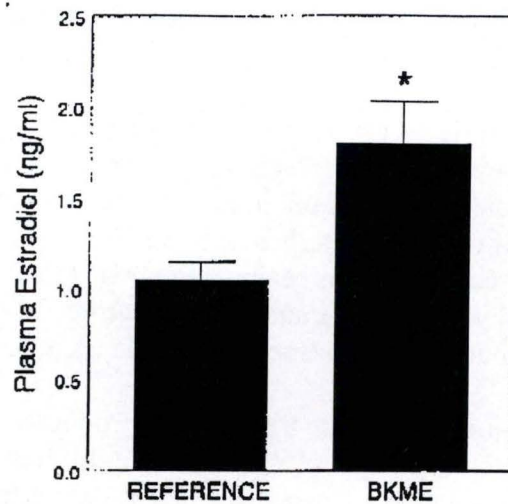


Fig.20 : Concentrations en oestradiol plasmatique chez des white sucker (*Catostomus commersoni*) femelles collectés en aval de rejets d'une usine papetière (BKME) et dans un site de référence durant la période de maturation. \* indique une différence significative entre les valeurs. (Janz *et al.*, 1997).

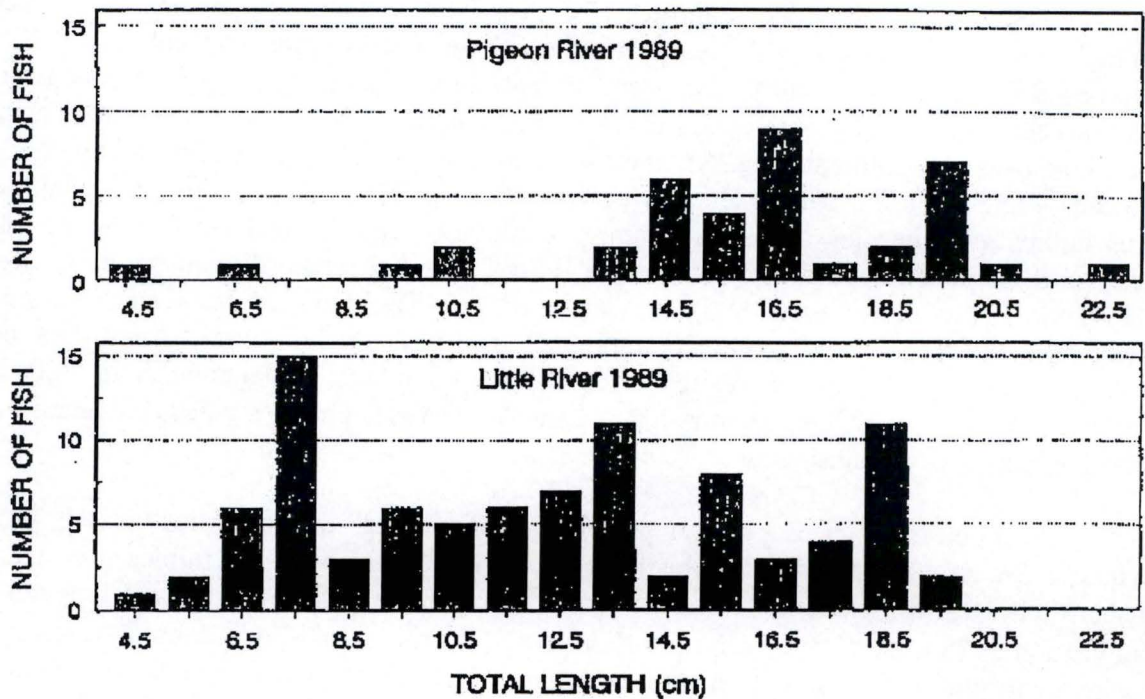


Fig. 21 : Histogrammes fréquence – taille de deux populations de redbreast sunfish (*Lepomis auritus*) collectés dans un site contaminé par des effluents d'usine papetière (Pigeon river) et dans un site de référence (Little river) en 1989 (Adams *et al.*, 1992).



des sites contaminés par le fait que les polluants interféraient avec le catabolisme naturel des stéroïdes par les monooxygénases hépatiques.

Notons enfin que certains polluants possèdent une activité “ oestrogénique ”, c'est-à-dire qu'ils peuvent être reconnus par les récepteurs à oestrogènes et ainsi induire une réponse inadéquate chez l'individu (Arukwe, 2001). Ainsi, plusieurs études ont pu montrer qu'une exposition à ces mimétiques d'oestrogènes provoque des réponses aberrantes chez les individus mâles (= féminisation). Ces perturbations comprennent la synthèse de protéines typiquement femelles comme la vitellogénine, le développement de caractères sexuels femelles, la régression testiculaire, voire même la mise en place d'un organe sexuel hermaphrodite (ovotestis), des comportements aberrants, ... (Kime, 1998 ; Arukwe, 2001). Certains cas de masculinisation des femelles lors d'une exposition à des mimétiques d'androgènes ont été observés mais ils sont toutefois moins fréquents (Arukwe, 2001). Parmi les substances possédant une activité oestrogénique (voire androgénique), il faut citer certains produits naturels végétaux comme le  $\beta$ -sitostérol, certains polluants environnementaux tels que les PCB ou certains insecticides, des produits pharmaceutiques (e.g. contraceptifs) mais surtout des mélanges complexes comme les effluents d'usines textiles ou papetières (Arukwe, 2001).

Les paramètres de la reproduction qui seront examinés au cours de cette étude sont le rapport gonado-somatique, les concentrations plasmatiques en E2, en testostérone (T) et en 11-KT.

### **2.3. Paramètres des populations**

La structure d'âge d'une population est un véritable indicateur de son état de santé. Selon Dajoz (2000), on peut distinguer trois types de répartition des classes d'âge. Le premier type est dominé par les classes jeunes et est caractéristique des populations à fort accroissement. Le second est à l'inverse dominé par les individus plus âgés et est caractéristique des populations en déclin. Le troisième type est intermédiaire, la répartition des classes d'âges y est uniforme et caractérise les populations stationnaires.

De nombreux auteurs ont recours à l'analyse d'histogrammes “ fréquence - taille ” lorsque les données concernant l'âge des individus ne sont pas disponibles. Ces graphiques permettent toutefois de discerner une répartition approximative des classes d'âges dans une population.

Plusieurs études ont examiné l'effet de contaminations environnementales sur la structure des populations de poissons. Ainsi, Adams *et al.* (1992) ont constaté que la population de redbreast sunfish vivant dans un milieu contaminé par des effluents d'usines papetières était dominée par des individus plus gros et plus vieux que ceux de la population de référence et surtout que les stades jeunes étaient sérieusement touchés (fig.21). Ceci rapproche la population du site contaminé d'une population de type 2, donc en régression. D'autres études ont montré des résultats similaires chez la truite fario et la loche franche (Siligato & Böhmer, 2001, 2002), les auteurs expliquaient l'absence de stades jeunes chez la loche par un changement dans la stratégie de reproduction. En effet, les loches du site pollué semblaient favoriser une reproduction sur plusieurs années, avantageant l'espérance de vie des individus au détriment du coût reproductif saisonnier. Ceci pourrait être une stratégie augmentant les chances de survie d'une population vivant dans un milieu instable (Siligato & Böhmer, 2001).



Tab. 10 : Représentation de la qualité ichthyologique des cours d'eau wallons (modifié d'après Philippart & Vranken, 1983).

Classe	Caractéristiques
0	absence naturelle des poissons
1	aucune capture par pêche électrique : ichtyofaune nulle ou quasi nulle
2	présence d'un faible nombre d'espèces très polluo-résistantes (souvent épinoche et/ou loche franche) et ichtyomasse inférieure à 50 Kg/ha
3	ichthyocénose et populations très altérées (disparition ou forte régression des espèces sauvages originelles et ichtyomasse nettement inférieure à la normale)
4	ichthyocénose qualitativement altérée (disparition ou forte régression de plusieurs espèces) mais biomasse proche de la normale du fait des rempoissonnements, de facteurs locaux de concentration démographique et de phénomènes de remplacement d'espèces (par ex : remplacement du barbeau par le chevaine)
5	ichtyomasse normale mais absence, rareté ou régression généralisée des espèces oxyphiles très polluo-sensibles (truite fario, chabot, ablette spirin, ombre)
6	communauté ichthyologique non altérée (sans tenir compte de la disparition ancienne de certaines espèces) et peu affectée par la pêche et les pratiques d'aménagement piscicole

Tab. 11 : Paramètres et critères de cotation de l'IBI américain (traduit d'après Karr, 1981, in Didier, 1997).

Catégories	Critères de cotation		
	5	3	1
<b>- Composition et richesse spécifique</b>			
1. Nombre total d'espèces	les paramètres 1 à 5 varient avec la taille du cours d'eau		
2. Nombre d'espèces « darter »			
3. Nombre d'espèces « sunfish »			
4. Nombre d'espèces « sucker »			
5. Nombre d'espèces intolérantes			
6. % d'individus « green sunfish »	< 5	5-20	> 20
<b>- Composition trophique</b>			
7. % d'individus omnivores	< 20	20-45	> 45
8. % d'individus cyprinidés insectivores	> 45	45-20	< 20
9. % d'individus piscivores (super carnivores)	> 5	5-1	< 1
<b>- Condition et abondance des poissons</b>			
10. Nombre d'individus dans l'échantillon	varie avec la taille du cours d'eau		
11. % d'individus hybrides	0	0-1	> 1
12. % d'individus avec anomalies, maladies, etc.	0-2	2-5	> 5



Cependant, de nombreux facteurs environnementaux sont susceptibles d'influer sur la structure d'une population. C'est notamment le cas d'une prédation sélective ou de mécanismes dépendant de la densité. Moe *et al.* (2002) ont ainsi pu mettre en évidence l'existence d'effets positifs indirects d'une contamination au cadmium (Cd) chez des mouches (*Lucilla sericata*) causés par des mécanismes dépendants de la densité. Les auteurs observaient une survie plus importante chez les asticots en fin de stade larvaire dans une population exposée au Cd par rapport à la population contrôle. Cette survie était expliquée par une compétition réduite entre les larves résultant d'une reproduction altérée par le toxique, et par la sensibilité des jeunes larves au Cd. Tout ceci se traduisait par des effectifs plus faibles, mais pour lesquels la compétition intraspécifique était diminuée et les ressources plus accessibles et plus importantes. Adams *et al.* (1992) observaient le même phénomène dans une population de redbreast sunfish.

## **2.4. Analyse des communautés ichthyologiques**

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les communautés ichthyologiques peuvent être utilisées pour la surveillance biologique des systèmes aquatiques (Karr, 1981). Les poissons présentent en effet de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes de biomonitoring (Attrill & Depledge, 1997). D'abord, ils sont présents dans tous les systèmes aquatiques, y compris dans ceux fortement pollués. Ils ont de plus, en général, une durée de vie relativement longue, c'est pourquoi ils intègrent dans le temps les variations de leur environnement. Les poissons sont faciles à identifier et les informations sur la biologie des différentes espèces sont bien connues. Les communautés ichthyologiques incluent des espèces présentant une variété de niveaux trophiques et leur position au sommet de la chaîne alimentaire leur donne le rôle d'intégrateurs de toutes les composantes de l'écosystème. Suite à leur grande capacité de déplacement, les poissons résistent mieux aux perturbations à court terme car ils peuvent aisément atteindre des zones de refuge. Ils sont donc aussi des intégrateurs spatiaux de la qualité du milieu. Il existe un grand intérêt du public à l'égard des poissons et, par ce biais, il est possible de le sensibiliser aux problèmes de conservation des milieux aquatiques. Les poissons sont donc des intégrateurs de la réponse des autres composantes de l'écosystème (les autres populations animales, végétales, l'habitat, ...) puisqu'ils dépendent de celles-ci au niveau de leur reproduction, de leur croissance et de leur survie. Cependant, il existe aussi certaines limites à l'utilisation des communautés ichthyologiques comme bioindicateurs (Attrill & Depledge, 1997 ; Didier, 1997). Premièrement, il est assez difficile d'obtenir un échantillonnage quantitatif, ceci est principalement dû à la nature sélective des méthodes de capture. De plus, l'échantillonnage demande un coût important en matériel et en personnel. Ensuite, Attrill & Depledge (1997) soulignaient le conflit entre la mobilité et la fidélité. En effet si la mobilité des poissons peut être considérée comme un avantage leur permettant d'intégrer les conditions présentes sur de grandes surfaces, elle peut être un facteur négatif influant sur la fidélité : en effet, tout changement dans la structure des communautés devrait refléter une perturbation du milieu et ne pas être due à des mouvements cycliques naturels. Enfin, le fait d'utiliser seul le plus haut niveau d'organisation biologique rend difficile la détermination des mécanismes et des processus exacts responsables du changement intervenu.

L'utilisation des communautés ichthyologique est relativement récente. En Belgique, Philippart et Vranken (1983) proposaient une représentation synthétique de la qualité ichthyologique des cours d'eau wallons selon 6 classes définies sur la base de critères quantitatifs (nombre d'espèces, biomasse totale) et qualitatifs (espèces présentes et abondance



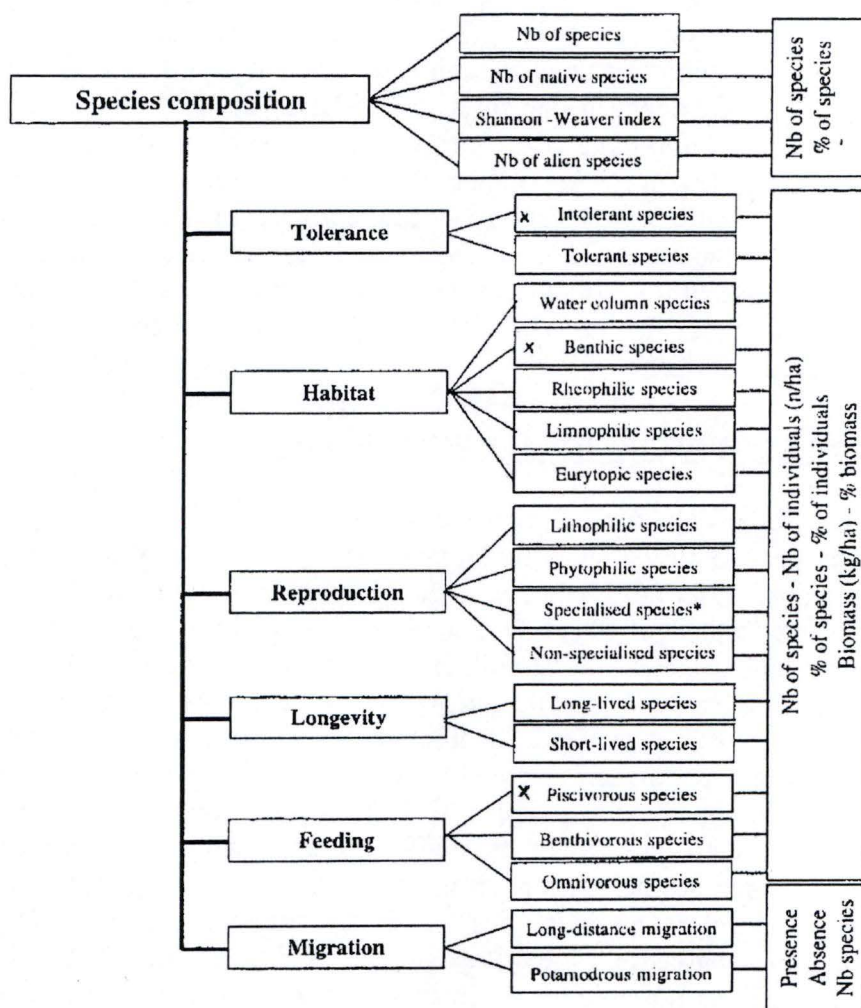


Fig. 22: Liste des métriques de la catégorie "composition spécifique" retenues par les partenaires du projet FAME (Kestemont & Goffaux, 2002).

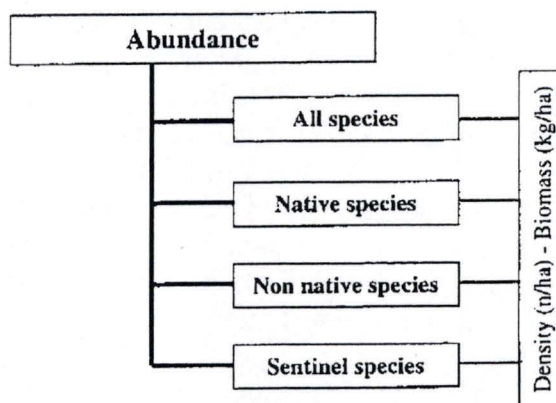


Fig. 23: Liste des métriques de la catégorie "abondance" retenues par les partenaires du projet FAME (Kestemont & Goffaux, 2002).



relative des espèces), par rapport aux potentialités naturelles des milieux définis d'après leurs caractéristiques physico-chimiques et physiographiques fondamentales (tab. 10).

Mais les poissons furent surtout utilisés aux Etats-Unis où Karr (1981) adopta une tactique basée sur la définition d'une série de mesures biologiques exprimant de manière simple et synthétique l'intégrité de l'écosystème aquatique. C'est ainsi que fut mis au point l'Index of Biotic Integrity (IBI). Celui-ci inclue 12 métriques réparties en 3 catégories : composition et richesse spécifique, composition trophique, condition et abondance des poissons (tab. 11). La valeur de chaque métrique est comparée à une valeur attendue pour un site aux caractéristiques identiques mais ne subissant pas d'influence humaine. Des scores de 5, 3, ou 1 sont attribués selon que la valeur obtenue est proche, un peu ou fortement déviée de la valeur attendue pour le site de référence. Les scores des 12 paramètres sont additionnés pour assigner au site d'échantillonnage une classe d'intégrité.

Depuis, les scientifiques de différents pays ont adapté le concept de l'IBI partout dans le monde (Didier, 1997; Oberdorff *et al.*, 2002 ; Simon, 2003). Avec chaque nouvelle version, la liste de métriques variait plus ou moins suivant la région, le pays ou le type de cours d'eau auquel l'indice était appliqué. La liste actuelle des métriques existantes contient environ 100 paramètres différents dont seul un petit nombre est utilisé dans chaque version (comme le nombre d'espèces, la proportion d'omnivores, ...), les autres métriques étant spécialement adaptées à l'ichtyofaune de différentes régions, pays ou types de cours d'eau (Kestemont & Goffaux, 2002). Par exemple, les scientifiques grecs et portugais doivent adapter leur liste de métriques aux problèmes majeurs des régions méditerranéennes, c'est-à-dire une faible richesse spécifique, un haut degré d'endémisme, et surtout la forte tolérance des espèces endémiques aux conditions dégradées, puisque celles-ci sont adaptées à vivre dans des milieux extrêmement variables, avec des fluctuations spatiales, annuelles ou saisonnières marquées au niveau de la quantité d'eau, de la vitesse du courant, de la température et de l'oxygène dissous. De même, dans d'autres pays (Pays-Bas) ou régions (Flandre en Belgique), les métriques utilisées sont adaptées à la faible efficacité de capture liée à la typologie des cours d'eau. Le réseau hydrographique de ces régions étant en effet majoritairement composé de larges rivières de plaines assez profondes dans lesquelles un échantillonnage quantitatif est difficile, voire impossible.

Dans l'optique de la réalisation d'un indice ichtyologique européen, les partenaires du projet FAME ont sélectionné une série de métriques réparties en trois catégories en accord avec la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (Kestemont & Goffaux, 2002):

### **1) Métriques relatives à la composition spécifique**

Cette catégorie inclue tous les aspects fonctionnels des communautés ichtyologiques et se réfère à la classification des espèces par guildes écologiques. Il existe plusieurs manières d'exprimer le même paramètre. Ainsi, chaque métrique peut être mesurée selon le nombre d'espèces présentes, le nombre ou le pourcentage d'individus appartenant à ces espèces, la biomasse de ces espèces ou le pourcentage de la biomasse totale représentée par ces espèces. La figure 22 propose la liste de métriques retenue par les partenaires de FAME pour cette première catégorie. Les métriques relatives à la tolérance font référence à la sensibilité des espèces aux dégradations physico-chimiques de l'eau alors que les altérations du milieu physique sont prises en compte par les métriques de la classe "habitat". Les classes "reproduction" et "trophiques" font surtout référence au type et au niveau de spécialisation des



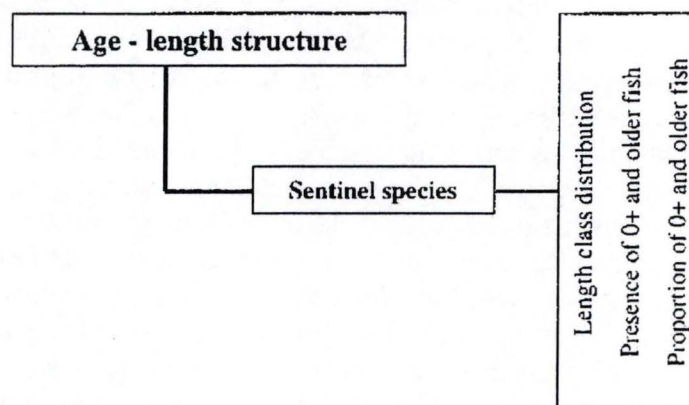


Fig. 24: Liste des métriques de la catégorie "structure d'âge / de taille" retenues par les partenaires du projet FAME (Kestemont & Goffaux, 2002).

espèces. La classe "migration" mettra plus particulièrement en évidence des perturbations de la connectivité des cours d'eau.

## **2) Métriques relatives à l'abondance**

Comme pour la catégorie précédente, il existe plusieurs manières d'exprimer la même métrique. Ici, la densité (nombre d'individus/ha) et la biomasse (kg/ha) ont été retenues. L'utilisation des espèces natives permet d'exclure les espèces non-inféodées à la station échantillonnée qui augmentent de façon biaisée la richesse spécifique (Didier, 1997). L'abondance d'espèces d'intérêt (ou sentinelles) peut être utilisée pour des espèces considérées comme de bons indicateurs du niveau de dégradation au sein d'une écorégion donnée. Les métriques de cette catégorie proposées par le projet FAME sont illustrées à la figure 23.

## **3) Métriques relatives à la structure de taille / d'âge**

Les distributions fréquence - taille sont généralement plus facile à réaliser que les distributions tenant compte de l'âge des individus. Ce sont donc ces distributions qui sont les plus utilisées pour caractériser l'état de santé des populations d'espèces d'intérêt. Le calcul d'un rapport entre juvéniles (0+) et individus adultes peut également être envisagé. L'utilisation de métriques spécifiques aux populations est intéressante en ce sens qu'elle permet de résoudre le problème général de faible diversité de l'ichtyofaune européenne. En effet, cette faible diversité limitait quelque peu l'emploi d'indices dont les descripteurs s'intéressent exclusivement à la structure des biocénoses. Les métriques de cette catégorie proposées par le projet FAME sont illustrées à la figure 24.

Au vu des objectifs de ce travail, les métriques que nous utiliserons comme descripteurs biologiques des communautés ichthyologiques seront soit des paramètres généraux (comme par exemple le nombre total d'espèces), soit des paramètres particulièrement sensibles aux dégradations chimiques du milieu. Ces métriques seront discutées en profondeur ultérieurement.





Fig. 25: Le chevaine (*Leuciscus cephalus*, L.) ([http://www.udive.ch/photos/fish\\_swisslake.html](http://www.udive.ch/photos/fish_swisslake.html))

### **3. DESCRIPTION DE L'ESPECE ETUDIEE: LE CHEVAINE** **(*Leuciscus cephalus*, L.)**

#### **3.1. Description générale**

Le chevaine (fig.25) appartient à la famille des Cyprinidae. Comme tous les représentants du genre *Leuciscus*, il possède des nageoires sans rayon dur et dentelé, une dorsale courte (8 à 14 rayons), une anale aussi longue que la dorsale (8 à 15 rayons) commençant en arrière de la base de la dorsale ainsi qu'une ligne latérale ininterrompue. Son corps est fusiforme, à section circulaire. Sa tête est large et fendue d'une grande bouche terminale aux lèvres molles. La nageoire caudale est faiblement échancrée. Toutes les autres nageoires présentent des bords libres arrondis (Keith & Allardi, 2001). On distingue jusqu'à 9 sous-espèces en Europe. Le corps est argenté plutôt sombre, le dos brun-vert à reflets bleu contraste avec un ventre blanchâtre. Les nageoires, habituellement rosées, se colorent en rouge lors de la reproduction. Le mâle est généralement plus petit que la femelle. Comme d'autres cyprins, il porte des tubercules nuptiaux sur le sommet du crâne à l'approche de la reproduction. On distingue le chevaine de la vandoise (*Leuciscus leuciscus*) par sa nageoire anale convexe, alors qu'elle est concave chez cette dernière. Sa taille est généralement comprise entre 10 et 30 cm mais il peut atteindre 65 cm pour un poids de 4 kg (Keith & Allardi, 2001).

Le chevaine occupe un large spectre d'habitats différents, de la zone à truite à la zone à brème. Son preferendum se situe néanmoins au niveau des eaux courantes fraîches et bien oxygénées (espèce rhéophile et oxyphile) des zones à ombre et à barbeau. L'espèce n'est pas exigeante en matière de qualité de l'eau puisque la teneur en oxygène peut descendre en dessous de 6 mg/l avec des températures au dessus des 30°C. La reproduction nécessite une température moyenne mensuelle supérieure à 12°C. C'est pourquoi elle a généralement lieu de mi-avril à mi-juin, quand l'eau atteint 15°C. La maturité sexuelle est atteinte aux environs de la troisième année de croissance chez les mâles et vers la quatrième chez les femelles. Les reproducteurs se rassemblent à proximité d'un radier pour frayer. Les œufs sont déposés sur le substrat dans ces zones de courant (pondeur lithophile) à raison de 57000 œufs par kg. L'incubation est de 60 à 80 degrés-jours, soit 3 à 4 jours à 18°C. Les juvéniles vivent en petits groupes proches de la surface dans les zones peu profondes. Avec l'âge, ils deviennent moins grégaires et gagnent les zones plus profondes. Totalement omnivore, le chevaine peut se nourrir de plantes aquatiques, de débris organiques divers et d'invertébrés. Les individus les plus gros mangent parfois des poissons ou des grenouilles (Philippart & Vranken, 1983 ; Keith & Allardi, 2001).

Le chevaine est présent dans toute l'Europe à l'exception de quelques régions comme le nord de la Scandinavie, le sud de l'Italie ou l'extrême ouest du continent (Keith & Allardi, 2001). En Wallonie, il est présent dans les 4 grands bassins hydrographiques (Philippart & Vranken, 1983).

#### **3.2. Utilisation dans le biomonitoring**

Le chevaine a souvent été utilisé dans des études écotoxicologiques, principalement à cause de sa large répartition dans les cours d'eau. Ainsi, Andres *et al.* (2000) ont pu remarquer que les chevaines, tout comme les gardons, accumulaient plus le cadmium et le zinc que la perche (*Perca fluviatilis*) et la brème (*Abramis brama*). Il fut aussi utilisé par



Masson *et al.* (2002) pour évaluer le stress dû à l'acidité par la concentration en  $\text{Cl}^-$  dans le sang. Plusieurs biomarqueurs furent également mesurés sur le chevaine. Viganò *et al.* (2002) ont évalué la toxicité des sédiments dans le Po en Italie par la mesure d'adduits à l'ADN et de composés toxiques dans la bile chez des hotus, des barbeaux et des chevaines. Ces trois espèces étaient également utilisées par Vindimian *et al.* (1991) pour étudier l'induction de l'activité du cytochrome P450 par des contaminations aux PCB et HAP. Ils ont notamment pu montrer que le sexe influait sur le niveau basal d'activité EROD mais pas sur son taux d'induction. Flammariion *et al.* (2002) ont montré que la taille des individus devait être prise en compte lors de l'interprétation des mesures de l'activité cholinestérase chez des chevaines dans différentes rivières françaises. Devaux *et al.* (1998) utilisaient des mesures de dommages à l'ADN et d'induction du cytochrome P4501A chez le chevaine pour surveiller la pollution chimique dans le Rhône. Enfin, Sures & Sidall (2003) ont observé que les chevaines parasitées par *Pomphorhynchus laevis* accumulaient moins le plomb que les individus sains, ceci étant vraisemblablement dû à un mécanisme de prélèvement du plomb par les parasites.

L'intérêt du chevaine dans les études de biomonitoring se situe à plusieurs niveaux. Premièrement, il s'agit d'une espèce qui tolère relativement bien la pollution de l'eau. On a donc de grandes chances d'en retrouver dans les sites choisis comme références mais aussi dans les sites altérés où les espèces plus polluo-sensibles sont absentes. Ensuite, il convient de noter que l'espèce est bien représentée et que le prélèvement de quelques individus ne nuit pas de façon dramatique à l'équilibre du milieu. Les répercussions auprès du grand public sont également moins importantes lorsqu'il est nécessaire de sacrifier certains chevaines, à l'inverse du sacrifice de truites fario, d'ombres ou d'autres espèces d'intérêt halieutique qui amène beaucoup plus souvent matière à polémiques. Enfin, sa taille assez importante assure la présence d'un matériel biologique (foie, sang, gonades, ...) suffisant pour mener à bien toute une série d'analyses ultérieures.

# MILIEUX ETUDIES, MATERIEL ET METHODES



Tab. 12 : Caractéristiques des stations échantillonnées.

STATION	DATE	CODE	L (m)	l (m)	anodes	pH	O2 dissous (mg/l)	t° (°C)	remarques
Ton à Lamorteau	30/04/2003	TON	117	16,2	2	7,76	9,9	16,9	2e pêche uniquement pour l'analyse des communautés
	23/05/2003				2				
Semois à Chiny	05/05/2003	SEM	100	22,1	2	7,08	9,9	14,3	-
Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont	06/05/2003	VES	100	23	2	-	-	-	2e pêche pour recherche de chevaines supplémentaires
	13/05/2003				1				
Ourthe en amont de Maboge	09/05/2003	MAB	100	37	3	7	11	12,5	2e pêche pour recherche de chevaines supplémentaires
	20/05/2003				1				
Ourthe à Comblain-la-tour	15/05/2003	COM	113	31	3	-	-	-	-
Mehaigne à Wanze	22/05/2003	MEH	100	10	2	8,02	9,42	12,9	-

# **1. MILIEUX ETUDIES**

## **1.1. Choix des différentes stations**

Les différents sites ont été choisis en consultant plusieurs sources. Lors de son étude visant à adapter l'indice biotique d'intégrité ichtyologique au bassin de la Meuse, Didier (1997) a échantillonné 106 stations et les a classées par score d'indice croissant. Il en est ressorti que les stations de la Semois à Chiny, de l'Ourthe en amont de Maboge et de la Lesse à Daverdisse pouvaient être considérées comme références. Une confrontation des scores IBIP et de différents indices physico-chimiques (Indice de Pollution Organique, Qualité selon les normes de base, selon les normes ichtyologiques, ...) et biologiques (IBGN) dont le suivi est assuré par le Ministère de la Région wallonne (2000) a permis d'apporter un maximum de clarté quant à l'état de dégradation des différentes stations. Les recherches du professeur Thomé (LEAE, Laboratoire d'Ecologie Aquatique et d'Ecotoxicologie, Ulg) portant sur l'étude du niveau de contamination des rivières wallonnes par les PCB ont permis de sélectionner deux sites altérés sur base de la concentration en PCB dans les muscles de chevaines et d'anguilles : la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont et l'Ourthe à Comblain-la-tour (Thomé, communication personnelle). Le choix du Ton à Lamorteau a été établi en confrontant les résultats de Didier (1997) avec ceux du GIREA (2000) qui avait réalisé un rapport étudiant l'impact des rejets de l'usine de pâte à papier Burgo-Ardenne sur les milieux récepteurs. Les deux études s'accordaient pour conclure que la rivière était fortement modifiée par de tels rejets. La Mehaigne à Wanze a été sélectionnée sur base des différents indices de qualité du Ministère de la Région wallonne. La base de données hydrobiologiques et ichtyologiques du Centre de Recherches de la Nature, des Forêts et du Bois a enfin été consultée pour se rendre compte du nombre et de la taille des chevaines capturés sur les différents sites présélectionnés. Il en est notamment ressorti que la station de la Lesse à Daverdisse ne comportait pas assez de chevaines pour réaliser les prélèvements et pour assurer une étude populationnelle. Les six stations sélectionnées se situent toutes dans la zone moyenne, entre la zone à ombre inférieure et la zone à barbeau supérieure (Huet, 1969). Le tableau 12 reprend les caractéristiques principales des stations échantillonnées.

## **1.2. Description des sites étudiés**

### **1.2.1. Le Ton à Lamorteau**

Le travail du GIREA (2000) associait cette station à la zone à barbeau sur base des mesures de pente (1,25 ‰) et de la largeur moyenne du cours (+/- 10 m). Le fond est constitué de galets et de graviers, mais les sédiments fins sont importants. Le courant y est assez rapide et la température annuelle mesurée atteint 14.6 °C (GIREA, 2000). Les résultats de campagnes de mesures plus anciennes (GIREA, 1992) indiquaient que la température pouvait augmenter de plus de 5°C entre la station amont et la station en aval de l'industrie de pâte à papier Burgo-Ardenne. Les matières en suspension atteignaient des valeurs importantes de 30mg/l et les concentrations en chlorures et sulfates étaient également élevées. Le rapport du GIREA pour l'année 2000 montrait cependant une nette amélioration de la qualité de cette station, spécialement au niveau des organochlorés et des dioxines dont les concentrations dans l'eau et les sédiments étaient faibles, toujours en deçà des normes autorisées. La qualité biologique de cette station a été évaluée par plusieurs indices basés sur les diatomées et sur les invertébrés benthiques. Les résultats montraient des valeurs moyennes mais en amélioration par rapport à l'étude de 1992. Le recensement ichtyologique effectué sur



cette station confirmait cette bonne évolution. Dix espèces y avaient été répertoriées pour une biomasse totale de 411.2 kg/ha, dominée par le chevaine et le goujon. Lors de nos prélèvements, nous avons enregistré une température de 16,9°C, une concentration en oxygène dissous de 9,9 mg/l et un pH de 7,76.

### **1.2.2. La Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont**

La Vesdre a toujours été réputée pour sa pollution aiguë résultant pour l'essentiel des nombreuses firmes textiles installées sur son cours (Dewandel, 1994). Cette pollution est observée à plusieurs niveaux : pollution trophique et organique, métaux lourds, et plus récemment PCB (mesurés dans les muscles de chevaines et d'anguilles ; Thomé, communication personnelle). Philippart & Vranken (1983) classaient la station de Vaux-sous-Chèvremont comme appartenant à la zone à ombre sur base des mesures de pente (5,2 ‰) et de largeur (25 m). Le courant y est assez soutenu et le fond est composé de blocs et de graviers. Le choix de cette station a été dicté par l'examen commun des scores IBGN et des indices physico-chimiques (Ministère de la Région Wallonne, 2000) ainsi que des données de contamination des chevaines dans les muscles desquels les concentrations en PCB pouvaient dépasser les 375 ppb. Les recensements ichtyologiques de la Vesdre ont souvent révélé des biomasses faibles. Aucun paramètre physico-chimique n'a été mesuré lors des échantillonnages.

### **1.2.3. La Mehaigne à Wanze**

Classée par Philippart & Vranken (1983) comme station appartenant à la zone à barbeau (largeur moyenne de 8 m et pente de 1,5 ‰), la Mehaigne à Wanze est une station caractérisée par une pollution de type agricole. Le courant y est vif, le fond composé de blocs et de graviers ainsi que de dépôts plus fins dans les zones plus calmes et plus profondes. Les résultats des prélèvements effectués par le Ministère de la Région Wallonne (2000) sur une station légèrement en amont concluent à une pollution organique modérée, une non-conformité aux normes ichtyologiques (de 1994 à 1998) ainsi qu'aux normes de qualité de base (1997 et 1998), principalement due à la présence d'hexachlorocyclohexane (lindane) traduisant des pratiques agricoles intensives. Philippart & Vranken (1983) soulignaient d'ailleurs la fréquence élevée des pollutions toxiques accidentelles sur ce cours d'eau. Lors de notre échantillonnage, la température atteignait 12,9°C, la concentration en oxygène dissous était de 9,42 mg/l et le pH de 8,02.

### **1.2.4. L'Ourthe à Comblain-la-tour**

Cette station, classée dans la zone à ombre sur base des mesures de pente (1,6 ‰) et de largeur (30 m) (Philippart & Vranken, 1983), a été choisie comme site contaminé par les PCB sur base des résultats de recherches du laboratoire d'écologie animale et d'écotoxicologie de l'Université de Liège. Les valeurs de contamination des chevaines y étant normales (< 75 ppb) mais les anguilles montrant une sévère contamination (> 375 ppb). Notons que dans sa thèse, Didier (1997) classait la station de Comblain-au-Pont (quelques kilomètres en aval) comme un secteur de bonne qualité avec un score IBIP atteignant 25/30. Le courant est rapide et le fond est composé de blocs et de graviers. Dans son mémoire de licence, Dewandel (1994) soulignait que la qualité des eaux de l'Ourthe commençait à se dégrader après sa confluence avec l'Amblève à Comblain-au-Pont et ce jusqu'au confluent avec la Meuse à Liège. Aucun paramètre physico-chimique n'a été mesuré lors des échantillonnages.



### **1.2.5. L'Ourthe en amont de Maboge**

Située en amont de la précédente, cette station est classée en zone à ombre au vu des mesure de pente (2 ‰) et de largeur (40 m) (Philippart & Vranken, 1983). Les caractéristiques physiques de l'Ourthe à cet endroit, à savoir une alternance de longs radiers et de zones plus calmes, ainsi qu'un parcours essentiellement forestier dans une vallée encaissée, un courant moyen et un substrat (blocs et graviers) propre, confère à la station un aspect sauvage et naturel. Les valeurs de qualité biologique du Ministère de la Région Wallonne (2000) pour ce site sont bonnes à excellentes. Didier (1997) classait d'ailleurs cette station parmi les scores IBIP les plus élevés obtenus sur le bassin de la Meuse (27/30). Notons que les difficultés d'accès à la rivière nous ont forcées à échantillonner un long radier flanqué en rive gauche d'une coulée au courant et à la profondeur plus considérables. Lors de notre échantillonnage, la température de l'eau était de 12,5°C, la concentration en oxygène dissous avoisinait les 11 mg/l et le pH était de 7.

### **1.2.6. La Semois à Chiny**

Cette station a été désignée comme second site de référence au vu des différents indices mesurés (Ministère de la Région Wallonne, 2000). Didier (1997) classait cette station comme bonne au niveau de la qualité évaluée par les peuplements ichtyologiques avec un score de 25/30. Timmermans & Gérard (1989, cité dans Dupont, 1998) classaient la Semois à Chiny comme appartenant à la zone à barbeau sur base de la largeur (24 m) et de la pente (1,3 ‰). Ils signalaient que les communautés ichtyologiques se composaient de 11 espèces et que celles-ci étaient dominée par les cyprins d'eau vive (barbeau, hotu et chevaine). Le courant y est moyen à soutenu avec un substrat composé de cailloux et de graviers. Lors de notre échantillonnage, la température de l'eau était de 14,3°C, la concentration en oxygène dissous valait 9,9 mg/l et le pH était de 7,08.

## **2. MATERIEL ET METHODES**

### **2.1. Pêches électriques**

Les stations ont été échantillonnées durant les deux premières semaines du mois de mai 2003 par pêche électrique à pied sur un secteur de 100 m. La longueur et la largeur moyenne (basée sur trois mesures) du secteur ont été mesurées à l'aide d'un topofil Chaix dont la précision est de l'ordre du dm afin d'en déduire la superficie. La pêche s'est déroulée avec 1, 2 ou 3 groupes électrogènes DEKA générant un courant redressé utilisé à +/- 300 volts pour une intensité de 2 à 6 ampères. L'équipe de terrain était proportionnelle à la taille du cours d'eau et au nombre d'anodes requises. Les deux passages se faisaient successivement, avec séparation dans des bacs de stockage des poissons du premier et du second passage. Les prélèvements sur les chevaines commençaient soit après les deux passages, soit pendant le deuxième passage suivant l'importance de l'équipe et le nombre de poissons capturés. Mis à part les chevaines sacrifiées pour les prélèvements, tous les poissons étaient remis à l'eau une fois l'inventaire ichtyologique terminé. Des données individuelles de longueur (longueur totale en mm) et de poids (en g) ont été prises pour chaque espèce. Pour les petites espèces à densité importante, un poids moyen était mesuré et le nombre d'individus comptés. Lorsque les poissons capturés sur une station étaient trop nombreux, seule la longueur a été mesurée,



le poids pour ces poissons a été calculé à partir d'une équation de type  $P = a \cdot L^b$ , établie pour chaque espèce grâce à l'ensemble des données de poids et de longueur obtenues sur les autres stations. Ceci a été réalisé pour la station de la Semois à Chiny et pour les truites fario de l'Ourthe à Maboge. L'ensemble des données de l'inventaire a été introduit pêche par pêche, en séparant premier et second passage, sur le logiciel Excel. Il est repris dans l'annexe 1. La température de l'eau et la concentration en oxygène dissous ont été mesurées grâce à un oxymètre YSI 58, la mesure du pH se faisant à partir d'un pH-mètre WTW 90.

## **2.2. Prélèvements sur les chevaines**

Les chevaines destinés aux prélèvements ont été assommés avant de subir une prise de sang dans la région ventro-caudale, juste en arrière de la nageoire anale. Cette prise de sang a été réalisée à l'aide d'une seringue de volume maximal égal à 1 ml sur laquelle était fixée une aiguille de diamètre adapté à la taille du poisson (0,5 ou 0,6 mm). L'aiguille a été héparinée avant le prélèvement pour prévenir toute coagulation durant l'opération. La concentration de l'héparine utilisée était de 25000 unités par ml sauf pour les stations de Lamorteau et de Comblain-la-tour où des problèmes ont été rencontrés et où de l'héparine à 5000 unités par ml a été employée. Un volume de sang de 0.6 à 1 ml était alors aspiré avant d'être stocké dans des tubes en polyéthylène ayant préalablement reçu quelques gouttes d'héparine. Les prélèvements sanguins ont été conservés dans la glace jusqu'à notre retour au laboratoire.

Les poissons étaient ensuite sacrifiés par incision de la colonne vertébrale au niveau de la nuque et rupture de la moelle épinière. Ils ont ensuite été soigneusement ouverts en évitant de percer tout organe. Le sexage a eu lieu à ce moment. Le foie a été rapidement prélevé, lavé dans une solution de KCl 150 mM, et réparti dans plusieurs cryotubes de 2 ml annotés du nom de la station et du numéro de poisson. Les aliquots ont été partagés entre l'équipe de l'Ulg pour les dosages EROD et PCB et l'équipe des FUNDP pour les dosages de l'activité GST et des HSP70. Les cryotubes ont été stockés dans de l'azote liquide. Enfin, les gonades ont été prélevées et stockées dans la glace dans le but d'examens ultérieurs au laboratoire. Notons que la carcasse de chaque poisson a été récupérée par l'Ulg pour des analyses de PCB dans les muscles.

De retour au laboratoire, les échantillons de foie ont été stockés à -80°C. Les gonades ont été pesées au centième de gramme et un petit échantillon a été placé dans du liquide de Bouin en vue d'éventuelles analyses ultérieures. Les échantillons de sang ont été centrifugés à 3500 RPM pendant 15 minutes à 10°C. Le plasma a ensuite été stocké dans des eppendorfs à -80°C.

## **2.3. Dosage de l'activité EROD**

L'activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase a été mesurée par le LEAE (Ulg) où ce dosage se fait en routine. Le principe du dosage est basé sur la dééthylation de la 7-éthoxy-O-résorufine en hydroxyrésorufine dont la fluorescence est mesurée par spectrophotométrie. Le protocole de dosage se trouve en annexe 2.

## **2.4. Dosage des PCB**

Les PCB ont été dosés par le LEAE (Ulg). Le protocole de dosage se trouve en annexe 3.



## 2.5. Dosage de l'activité GST

Le protocole de dosage de la glutathione S-transferase (GST) employé lors de la réalisation de ce travail a été élaboré à partir de celui décrit par Habig *et al.* (1974). Il s'agit d'un dosage spectrophotométrique qui suit la réaction de couplage du glutathione réduit (GSH) au 1 chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB). La fraction cytosolique a été préparée à partir de l'aliquot de foie stocké à -80°C. Un morceau de tissu hépatique (maximum 1g) a donc été pesé avec une précision au millième de gramme et homogénéisé dans un volume égal à quatre fois le poids dans un tampon A (Tris-HCl 50 mM ; pH 7,4 ; EDTA 5 mM et KCl 150 mM). L'homogénéisateur utilisé était de type « POTTER ELVEHJEM » avec piston en téflon monté sur une foreuse dont l'axe tourne à la vitesse de 2800 RPM. L'homogénéisation a eu lieu pendant deux fois 15 secondes sur glace. L'homogénat a ensuite été pesé pour connaître sa dilution exacte puis centrifugé à 12500 RPM pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu a été centrifugé à 40000 RPM pendant une heure à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu a été aliquoté dans trois eppendorfs, deux étant prévus pour les duplicata de dosage GST et le troisième pour le dosage des protéines. Plusieurs réactifs ont été utilisés lors du dosage de l'activité GST : une solution 50 mM HEPES pH 7,5 ; une solution 50 mM de GSH dans du tampon HEPES et une solution 50 mM de CDBN dans l'éthanol. La procédure de dosage est la suivante : dans une cuvette, mettre 2 ml de tampon HEPES, 910 µl d'eau bidistillée, 40 µl de solution CDBN et 25 µl de surnageant 100000 g. L'absorbance à 340 nm dans la cuvette est suivie pendant 2 minutes pour établir une ligne de base. La réaction débute par l'addition de 25 µl de solution GSH et le changement dans l'absorbance à 340 nm dans la cuvette est suivi pendant 2 minutes. Les contrôles sont réalisés comme décrit plus haut mais sans GSH dans le mélange de réaction. L'activité enzymatique est calculée en utilisant le coefficient d'extinction de 9,6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> pour le CDBN conjugué, selon l'équation suivante : **activité GST exprimée en nmoles/min/ml de surnageant = (Δ A<sub>340 nm</sub>/min) - Abs. Blanc \* Facteur de dilution \* coefficient d'extinction molaire**, exprimée ensuite en nmoles/min/g tissu et en nmoles/min/mg protéines. Les protéines ont été dosées par la méthode décrite par Lowry *et al.* (1951). Cette méthode se base sur le principe qu'en milieu alcalin et en présence de sulfate de cuivre, les groupements réducteurs des protéines réagissent avec l'acide phosphomolybdique (réactif de FOLIN-CIOCALTEU) pour donner l'ion phosphomolybdeux qui absorbe à 660 nm. A un volume donné de fraction cytosolique, on ajoute 0,5 ml de tampon A / ml de fraction cytosolique, puis 500 µl de NaOH 1N. Après une durée de 30 minutes à deux heures, on additionne 5ml de solution cuivrique (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, tartrate K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 2% et CuSO<sub>4</sub> 1%). Après 15 minutes, on ajoute 500 µl de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 2 fois dans de l'eau bidistillée. 30 minutes plus tard, on mesure l'absorbance de la solution obtenue à 660 nm. Une solution de sérum albumine bovine (BSA) a été utilisée à plusieurs dilutions (soit 2,5 ; 5 et 10 µl traités comme la fraction cytosolique) pour réaliser une droite d'étalonnage permettant d'exprimer la concentration en protéines pour une absorbance donnée.

## 2.6. Dosage des protéines de stress HSP70

Le dosage des HSP70 a été réalisé par slot blot, c'est-à-dire transfert des protéines sur membrane en nitrocellulose (Biorad trans-blot, transfer medium, 9x12 cm, 0,45 µm) suivi d'un couplage immunologique des HSP70 avec un anticorps spécifique (Bioreagent MA3-006). La révélation a été rendue possible grâce à un anticorps secondaire (Goat Anti-mouse Alkaline Phosphatase Sigma A-3562) reconnaissant l'anticorps primaire. Cet « anti-anticorps » étant couplé à une enzyme (alkaline phosphatase) capable de transformer un substrat en composé coloré.



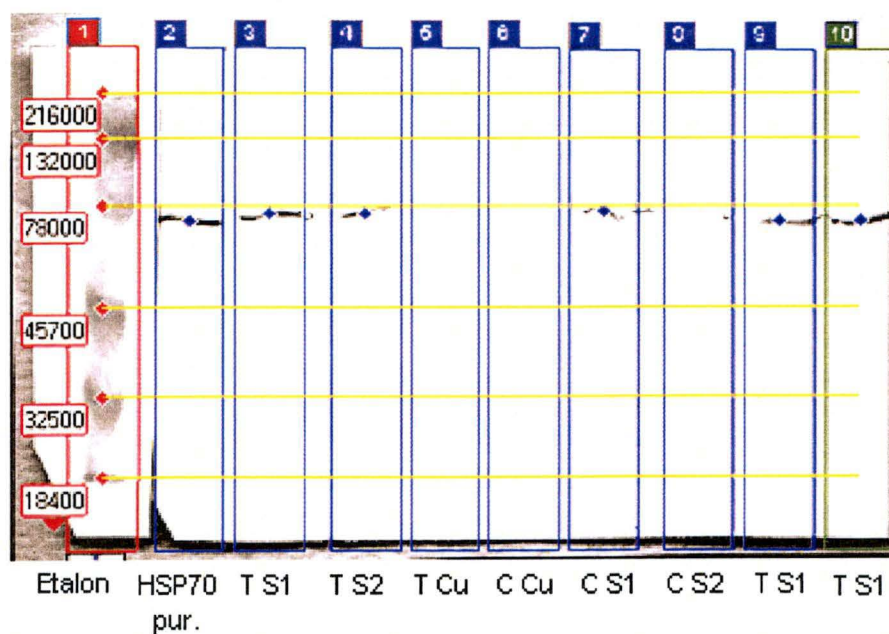


Fig. 26 : Western blot réalisé sur des foies de truites (T) et de chevaines (C) pour vérifier le bon fonctionnement de l'anticorps primaire. S1 = surnageant de première centrifugation 30 min. à 19800 G. S2 = surnageant de seconde centrifugation 30 min. à 19800 G. Cu = culot.

L'échantillon a été préparé à partir de l'aliquot de foie stocké à -80°C. Un morceau de tissu hépatique (maximum 1g) a donc été pesé avec une précision au millième de gramme et homogénéisé dans un volume égal à trois fois le poids dans un tampon d'homogénéisation (TRIZMA 50 mM, NP-40 1%, pH 7,6, inhibiteurs de protéases 1ml / 20 g de foie). L'homogénéisateur utilisé était de type « POTTER ELVEHJEM » avec piston en téflon monté sur une foreuse dont l'axe tourne à la vitesse de 2800 RPM. L'homogénéisation a eu lieu pendant deux fois 15 secondes sur glace. L'homogénat a ensuite été pesé pour connaître sa dilution exacte puis centrifugé à 19800 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu a été stocké dans la glace. Le culot a été resuspendu dans 1 ml de tampon d'homogénéisation puis centrifugé à 19800 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu a été ajouté au surnageant de première centrifugation. Le tout a été passé pendant quelques secondes sur un mélangeur électrique de type VORTEX puis aliquoté dans quatre eppendorfs, deux étant prévus pour les duplicata de dosage HSP70, un troisième pour le dosage des protéines et un quatrième constituant une « réserve ». Des expériences sur des sujets tests ont permis de constater qu'un tel protocole de centrifugation permettait de récupérer toutes les HSP70 présentes dans un échantillon (fig. 26). Une vérification du bon fonctionnement et de la spécificité de l'anticorps anti HSP70 a également été réalisée par western blot lors de ces tests (fig. 26). Les expériences de mise au point concluaient que l'anticorps utilisé reconnaissait bien les HSP70 et qu'il n'y avait aucune réaction croisée. Un dosage de protéine pour tous les échantillons (y compris les standards où du lait en poudre 1 mg/ml a été utilisé) a été réalisé par la méthode du réactif BioRad décrite par Bradford (1976) en utilisant une solution de sérum albumine bovine (BSA) à plusieurs dilutions (0, 2, 6 et 10 µl) pour réaliser la droite d'étalonnage. Les concentrations en protéines de chaque échantillon devaient impérativement être connues avant de commencer le dosage car la membrane ne peut fixer de manière optimale que 3 µg de protéines. Les échantillons et les étalons de HSP70 purifiée (StressGen SPP-755) ont donc dû être dilués correctement en prenant en compte le fait qu'un puits du slot blot ne peut contenir que 300 µl d'échantillon. Un volume supérieur d'échantillon a été préparé car il est nécessaire de faire bouillir ceux-ci pendant 5 minutes. 300 µl d'échantillons ont ainsi été placés sur les puits et ont ensuite été aspirés lentement sur la membrane. Une série de blancs contenant du tampon d'homogénéisation dilué 100 fois dans du tampon de dilution a également été aspirée sur la membrane. Après avoir soigneusement rincé chaque puits avec 300 µl de TBS, la membrane a été placée pendant une heure à température ambiante dans une solution de blocage (Blocking Agent Amersham 5% dilué dans du TBST : TBS + TWEEN 0,5 ml/l). Elle a ensuite subi deux lavages de 5 minutes au TBST et un lavage de 5 minutes au TBS. La membrane a alors été incubée pendant 1h30 dans un volume minimal d'anticorps primaire (anti HSP70 1/5000 dans une solution de Blocking Agent 2% + TBST). Elle a de nouveau été rincée selon la procédure précédente avant d'incuber pendant une heure dans l'anticorps secondaire dilué 1/2000 dans une solution de Blocking Agent 2% + TBST. Ensuite, la membrane a été lavée trois fois 5 minutes dans du TBST puis 5 minutes dans du TBS avant de subir une révélation colorimétrique. Pour ce faire, deux réactifs (37,5 µl BCIP Roche 1383221 + 50 µl NBT Roche 1383213) ont été mélangés dans un tampon Tris 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 0,05 M, pH 9,5 et la membrane a été mise à incuber dans la solution de révélation. La membrane a ensuite été séchée puis scannée grâce à un ImageScanner Amersham et au programme ImageMaster Labscan. La densité optique de chaque bande est évaluée par le logiciel ImageMaster TotalLab et les concentrations en HSP70 peuvent ainsi être calculées sur base d'une équation déterminée grâce aux valeurs étalons.



## 2.7. Dosage des stéroïdes sexuels plasmatiques (testostérone, 11-kétotestostérone et 17 $\beta$ -oestradiol).

Ce dosage a été effectué par une méthode radioimmunologique (Radioimmunoassay : RIA). Le protocole utilisé a été décrit par Fostier et Jalabert (1986). Son principe est basé sur la compétition entre une hormone marquée (**H\***) grâce à un isotope radioactif ( $H^3$  ou  $I^{125}$ ) et une hormone froide (**H°**) de concentration connue (standard) ou inconnue (échantillons), vis-à-vis d'un anticorps spécifique (**As**). Dans un premier temps, l'hormone froide est mise en contact avec l'anticorps spécifique. Elle se retrouve ainsi sous deux formes : libre ou complexée. On ajoute ensuite l'hormone marquée. La quantité d'anticorps et d'hormone marquée reste constante. Toute augmentation de la concentration en hormone froide entraîne une réduction du taux de fixation de l'hormone marquée. Par la suite, on sépare l'hormone marquée complexée à l'anticorps de l'hormone marquée libre. Il est dès lors possible de mesurer la radioactivité de l'une de ces deux fractions et d'en déduire la concentration en hormone froide présente dans l'échantillon. L'établissement d'une courbe standard permet de caractériser la décroissance du pourcentage d'hormone marquée qui se fixe à l'anticorps en présence d'une quantité connue et progressivement croissante d'hormone froide. Les stéroïdes sexuels doivent d'abord subir une double extraction qui permet de produire une rupture des liaisons hormone-protéines. Ensuite, on effectuera la compétition entre l'hormone froide (standards et échantillons) et l'hormone marquée vis-à-vis de l'anticorps. Après une incubation de 12 heures à 4°C, la séparation entre l'hormone marquée libre et l'hormone marquée complexée à l'anticorps se fait par centrifugation, décantation et rinçage. La dernière partie du dosage consiste à mesurer la radioactivité émise par chacun des tubes (cpm). Cette mesure est effectuée par un compteur  $\beta$  (BECKMAN LS 6000IC). Un système de calcul proposé par Fostier et Jalabert (1986) permet de transformer les valeurs exprimées en cpm en valeurs exprimées en pg/tube. La quantité réelle d'hormone présente dans l'échantillon est calculée selon la formule **Conc. (pg/ml) = Conc. (pg/tube) \* quantité de tampon reprise dans les stéroïdes extraits ( $\mu$ l) / quantité de plasma utilisée pour le dosage ( $\mu$ l) \* quantité de plasma extraite ( $\mu$ l)**. Notons que les mesures sont réalisées en duplicata pour chaque échantillon et standard. De plus, pour chaque hormone, on réalise une mesure de la radioactivité naturelle (background) et une mesure de la fixation totale. L'intégralité du protocole et les références des produits utilisés se trouvent en annexe (annexe 4).

## 2.8. Indices de condition

Le facteur de condition a été évalué par la formule  **$K = \text{Poids total du corps (g)} / (\text{Longueur totale du corps en cm})^3 * 100$** . Le rapport hépato-somatique (RHS) a été calculé par la formule  **$RHS = \text{Poids total du foie (g)} / \text{poids total du corps (g)} * 100$** . Le poids total de chaque foie a été calculé par l'addition du poids de chacun des aliquots pour un foie donné. Les tissus hépatiques ont été pesés avec une précision au millième de gramme. Le rapport gonado-somatique (RGS) a été calculé grâce à une formule semblable :  **$RGS = \text{poids total des gonades (g)} / \text{poids total du corps (g)} * 100$** .

## 2.9. Etude des populations de chevaines

L'ensemble des chevaines capturés sur un site a été réparti en groupes de longueurs de 10 mm comme lors de l'étude antérieure de Philippart (1972). Les histogrammes de fréquence – taille ont été réalisés pour chacune des stations à l'exception de l'Ourthe à Comblain-la-tour



où trop peu de chevaines ont été capturés lors des deux passages successifs sur le bief de 100 m.

## **2.10. Descripteurs biologiques des communautés ichthyologiques**

Un examen global de la structure des peuplements ichthyologiques a été mené dans un premier temps avant de passer à une analyse plus fine basée sur l'utilisation de descripteurs biologiques, ou métriques.

Les métriques utilisées lors de ce travail ont été sélectionnées parmi les descripteurs biologiques les plus susceptibles de répondre à des altérations de la qualité chimique de l'eau.

### *Nombre total d'espèces.*

Cette métrique est une mesure habituelle de la diversité spécifique. Celle-ci diminue généralement dans le cas de dégradations environnementales (Karr, 1981). Cependant, dans certaines circonstances d'accroissement de la productivité du milieu (eutrophisation), la richesse spécifique peut éventuellement augmenter (Oberdorff *et al.*, 2002).

### *Nombre d'individus benthiques.*

Cette métrique estime l'état de dégradation de l'habitat benthique. En plus de sa sensibilité à l'envasement ou au manque d'oxygène sur le fond, il s'agit d'un compartiment du milieu où certains polluants possédant une faible hydrosolubilité, une masse moléculaire élevée et une forte tendance à l'adsorption (*e.g.* PCB) peuvent se concentrer, fixés sur des particules ou dans les sédiments.

Une autre manière d'estimer l'état d'altération de l'habitat benthique est l'étude du rapport « chabot/loche » (Didier, 1997). Ces deux espèces occupent le même habitat mais possèdent des sensibilités très différentes à la pollution. Le chabot est une espèce intolérante à pratiquement toutes les formes de pollution alors que la loche est beaucoup plus résistante et a tendance à remplacer ce dernier lorsqu'une pollution s'installe. Ce rapport se calcule par la formule **nombre d'individus « chabot » / nombre d'individus « chabot + loche »**. La valeur obtenue est comprise entre 0 et 1.

De même, après l'examen global des peuplements ichthyologiques observés sur les différents sites échantillonnés, nous avons constaté, sur les sites altérés, la régression du barbeau au profit du goujon. Ces deux espèces occupant le même habitat mais faisant partie de guildes de tolérance différentes, nous avons étudié le rapport « barbeau / goujon » calculé par la formule **biomasse « barbeau » / biomasse « barbeau + goujon »**. Cette valeur varie également entre 0 et 1.

Enfin, une dernière métrique utilisée comme descripteur des peuplements ichthyologiques est le *nombre d'individus d'espèces intolérantes* (Oberdorff *et al.*, 2002). Les espèces intolérantes sont les premières à régresser lors d'une dégradation environnementale. Elles sont définies comme des espèces ayant une faible flexibilité quant à la qualité de l'eau et de l'habitat (Verneaux, 1981, in Oberdorff *et al.*, 2002).

L'appartenance d'une espèce à une guildes particulière est basée sur le tableau 13 pour lequel Oberdorff *et al.* (2002) ont synthétisé des informations fiables et récentes relatives à la classification des poissons des rivières françaises.



Tab. 13 : Classification par guildes des poissons des rivières françaises (modifié d'après Oberdorff *et al.*, 2002).  
N = native ; NN = non native ; PLA = planctivore ; INV = invertivore ; PIS = piscivore ; HER = herbivore ;  
OMN = omnivore ; LITHO = lithophile ; PHYTO = phytophile ; PHYLI = phytolithophile ; LITHP =  
lithopelagophile ; PSAMO = psammophile ; OSTRA = ostracophile ; ARIAD = ariadnophile ; POLPH =  
polyphile ; B = benthique ; P = pelagique ; R = rhéophile ; L = limnophile ; I = intolérant ; T = tolérant.

family/species	Origin	trophic guild	reproductive guild	habitat guild	coeff of water quality flexibility	degree of rheophily	coeff of habitat flexibility	tolerance guild
Petromyzontidae								
<i>Lampetra planeri</i> (LAMPLA)	N	PLA	LITHO	B	-	-	-	I
Salmonidae								
<i>Salmo trutta fario</i> (SALTRU)	N	INV	LITHO	P	5.5	R	0.03	I
<i>Salmo salar</i> (SAS)	N	INV	LITHO	P	-	R	-	-
Thymallidae								
<i>Thymallus thymallus</i> (THYTHY)	N	INV	LITHO	P	3	R	0.03	I
Esocidae								
<i>Esox lucius</i> (ESOLUC)	N	PIS	PHYTO	P	5.5	-	0.03	I
Cyprinidae								
<i>Rutilus rutilus</i> (RUTRUT)	N	OMN	PHYLI	P	8	-	0.46	T
<i>Leuciscus cephalus</i> (LEUCEP)	N	OMN	LITHO	P	7	-	0.55	T
<i>Leuciscus leuciscus</i> (LEULEU)	N	OMN	PHYLI	P	4.5	R	0.11	-
<i>Leuciscus souffia</i> (LEUSOU)	N	OMN	PHYLI	P	4	R	0.06	I
<i>Barbus barbus</i> (BARBAR)	N	OMN	LITHO	B	5	R	0.06	I
<i>Barbus meridionalis</i> (BARMER)	N	OMN	LITHO	B	-	R	-	-
<i>Alburnoides bipunctatus</i> (ALBBIP)	N	INV	LITHO	P	5	R	0.06	I
<i>Alburnus alburnus</i> (ALBALB)	N	OMN	PHYLI	P	7.5	-	0.42	T
<i>Abramis</i> sp. (ABRBRA et BLIBJO)	N	OMN	PHYLI	B	7	-	0.39	T
<i>Carassius carassius</i> (CARCAR)	N	OMN	PHYTO	B	-	L	-	-
<i>Cyprinus carpio</i> (CYPCAR)	NN	OMN	PHYTO	B	6	L	0.11	-
<i>Chondrostoma nasus</i> (CHONAS)	N	HER	LITHO	B	6	R	0.04	-
<i>Chondrostoma toxostoma</i> (CHOTOX)	N	OMN	LITHO	B	6	R	0.04	-
<i>Gobio gobio</i> (GOBGOB)	N	INV	PSAMO	B	5.5	-	0.12	-
<i>Phoxinus phoxinus</i> (PHOPHO)	N	OMN	LITHO	P	4.5	-	0.08	I
<i>Scardinius erythrophthalmus</i> (SCAERY)	N	OMN	PHYTO	P	6	L	0.08	-
<i>Rhodeus sericeus</i> (RHOSER)	N	HER	OSTRA	P	5.5	L	0.07	I
<i>Tinca tinca</i> (TINTIN)	N	OMN	PHYTO	B	6.5	L	0.12	-

Tab. 13 : Classification par guildes des poissons des rivières françaises (modifié d'après Oberdorff *et al.*, 2002) (suite).

Cobitidae								
<i>Nemacheilus barbatulus</i> (NEMBAR)	N	INV	LITHO	B	7	R	0.30	T
Ictaluridae								
<i>Ictalurus melas</i> (ICTMEL)	NN	INV	LITHO	B	6.5	L	0.03	-
Anguillidae								
<i>Anguilla anguilla</i> (ANGANG)	N	INV	-	B	-	-	-	-
Gadidae								
<i>Lota lota</i> (LOTLOT)	N	PIS	LITHP	B	4	R	0.13	-
Gasterosteidae								
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (GASACU)	N	OMN	ARIAD	P	-	L	-	T
<i>Pungitius pungitius</i> (PUNPUN)	N	OMN	ARIAD	P	-	L	-	-
Percidae								
<i>Perca fluviatilis</i> (PERFLU)	N	PIS	PHYLI	P	5	-	0.14	-
<i>Stizostedion lucioperca</i> (STILUC)	NN	PIS	PHYTO	P	7	-	0.27	-
<i>Gymnocephalus cernua</i> (GYMCER)	N	INV	PHYLI	B	7	-	0.27	-
Centrarchidae								
<i>Lepomis gibbosus</i> (LEPGIB)	NN	INV	POLPH	P	5.5	L	0.22	-
Cottidae								
<i>Cottus gobio</i> (COTGOB)	N	INV	LITHO	B	3	R	0.07	I



## **2.11. Analyses statistiques**

L'analyse statistique des résultats obtenus pour l'activité EROD, l'activité GST, le RHS, le RGS et les concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels consistaient en des analyses de la variance (ANOVA) visant à mettre en évidence d'éventuelles différences significatives entre stations, voire entre sexes. L'ANOVA a toujours été précédée d'un test d'homogénéité des variances, propriété indispensable pour poursuivre l'analyse. Le test de Levene a été utilisé dans la majorité des cas. Lorsque le test révélait des variances hétérogènes, celui de Brown-Forsythe a été utilisé. Une fois l'homogénéité des variances établie, l'ANOVA nous a permis de déceler ou non l'existence de différences significatives ( $p < 0,05$ ). Enfin, un test post-hoc HSD pour échantillons à effectifs inégaux a été utilisé pour mettre en évidence les stations (ou les sexes) qui différaient significativement entre eux ( $p < 0,05$ ). Ces analyses ont été menées sur le logiciel STATISTICA.

## RESULTATS



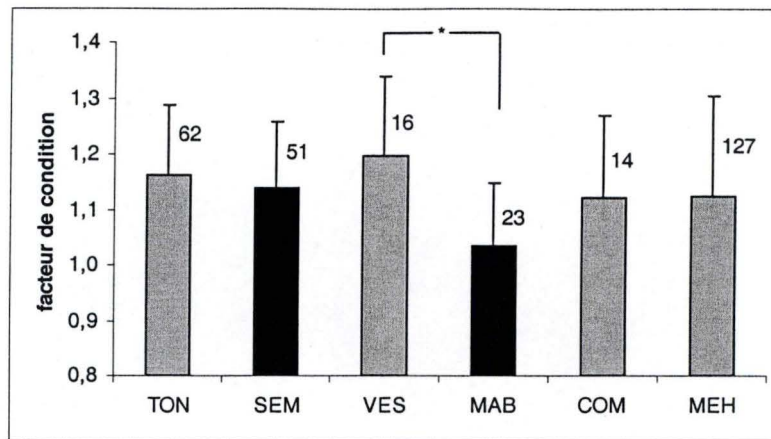


Fig. 27 : Facteur de condition mesuré sur les chevaines capturés sur les différents sites. En noir, les sites choisis comme référence ; en gris, les sites altérés. Les nombres à droite des barres d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés. \* = différence significative ( $p < 0,05$ ).

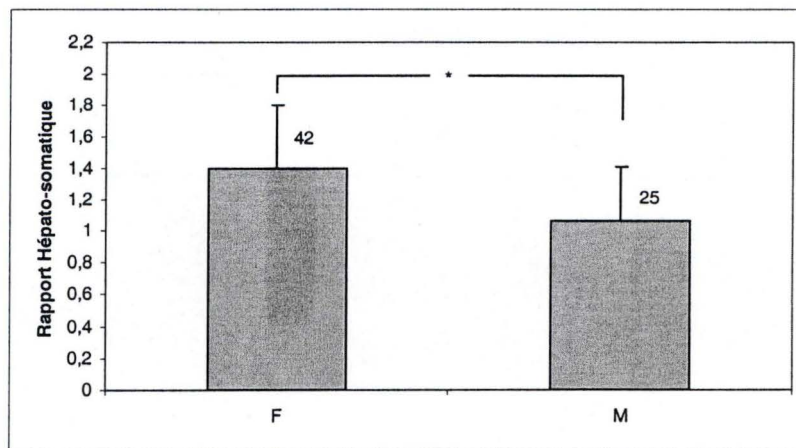


Fig. 28 : Différences dans le rapport hépatosomatique liées au sexe des individus. Les nombres à droite des barres d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés. \* = différence significative ( $p < 0,05$ ).

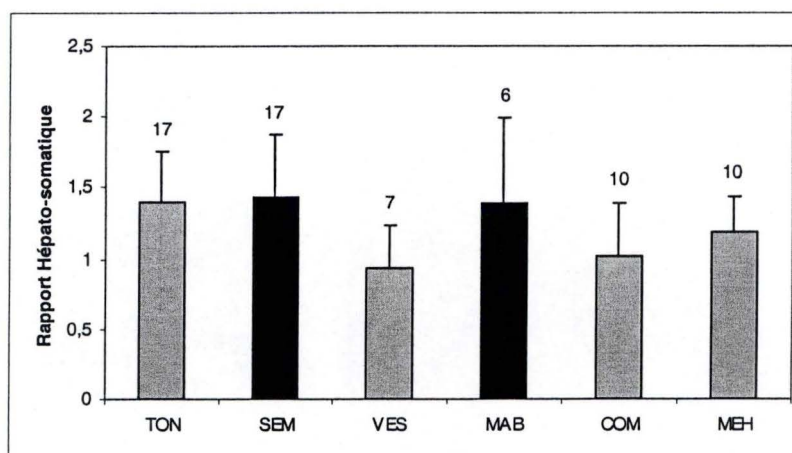


Fig. 29 : Rapport hépatosomatique mesuré sur les chevaines capturés dans les différentes stations. Les nombres au dessus des barres d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés.

## **1. Paramètres morphologiques et condition globale.**

### **1.1. Facteur de condition**

Les résultats du calcul du facteur de condition K pour les chevaines des différentes stations sont présentés à la figure 27. Les valeurs obtenues sont comprises entre 1,03 pour les chevaines de l'Ourthe en amont de Maboge et 1,20 pour les individus de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont.

Le test de Levene montre que les variances sont homogènes. L'ANOVA signale la présence de différences significatives entre les K mesurés sur les chevaines capturés sur les différentes stations. Un test de comparaison post-hoc HSD pour échantillons à effectifs inégaux révèle finalement que les chevaines de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont possèdent un K significativement plus élevé que ceux de l'Ourthe en amont de Maboge.

### **1.2. Rapport hépato-somatique**

Nous examinons ici les valeurs du RHS mesurées sur les chevaines des différentes stations. Notons que le poisson VES3 a été ignoré lors de l'analyse de ces résultats en raison d'une valeur très différente des autres mesures du RHS sur les poissons de la même station sans doute due à la taille plus réduite de ce poisson (18,5 cm alors que les chevaines étudiées mesuraient tous plus de 30 cm).

Les valeurs obtenues sont en moyenne de 1,39 chez les femelles et de 1,06 chez les mâles. En ce qui concerne les valeurs de RHS par station, elles sont comprises entre 0,94 pour les individus de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont et 1,44 pour les chevaines de la Semois à Chiny.

Le test de Levene a été utilisé avec succès pour prouver l'homogénéité des variances. L'analyse de la variance montre une différence significative entre les valeurs mesurées chez les mâles et celles mesurées chez les femelles ( $p < 0,01$  ; fig. 28). L'ANOVA signale également une différence significative entre les valeurs de RHS mesurées chez les chevaines capturés sur les différentes stations ( $p < 0,01$ ). Néanmoins, le test de comparaison post-hoc HSD pour échantillons à effectifs inégaux ne montre de différence significative entre aucune des stations échantillonnées (fig. 29).

### **1.3. Rapport gonado-somatique**

Les valeurs observées sont en moyenne de 10,2 chez les femelles et de 5,05 chez les mâles. En ce qui concerne les valeurs du RGS chez les chevaines femelles pour les différentes stations, les valeurs s'étalent de 6,2 sur l'Ourthe en amont de Maboge à 14 sur la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont.

Pour les individus femelles comme pour les mâles, le test de Levene ne démontre pas l'homogénéité des variances. Le test de Brown-Forsythe a donc été utilisé.

L'ANOVA menée sur les individus femelles montre des différences significatives entre les RGS mesurés sur les chevaines des différentes stations ( $p < 0,01$ ). Le test de comparaison post-hoc HSD pour échantillons à effectifs différents dénote une différence significative entre



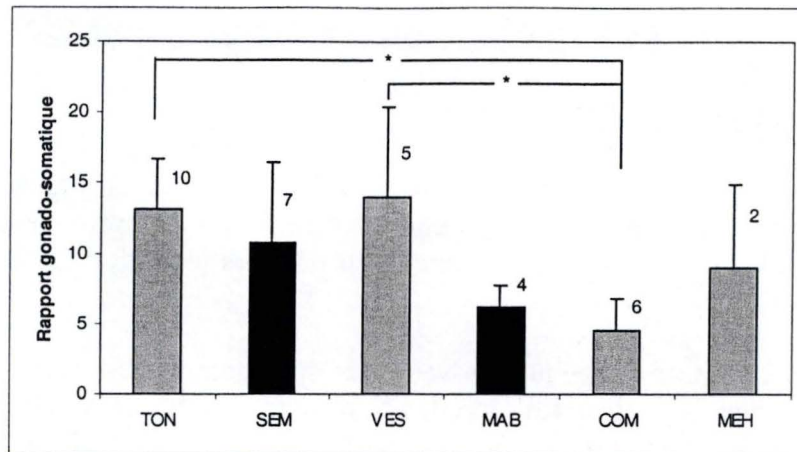


Fig. 30 : Rapport gonado-somatique mesuré sur les chevaines femelles des différentes stations échantillonnées. En noir, les sites choisis comme référence ; en gris, les sites altérés. Les nombres à droite de la barre d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés. \* = différence significative ( $p < 0,05$ ).

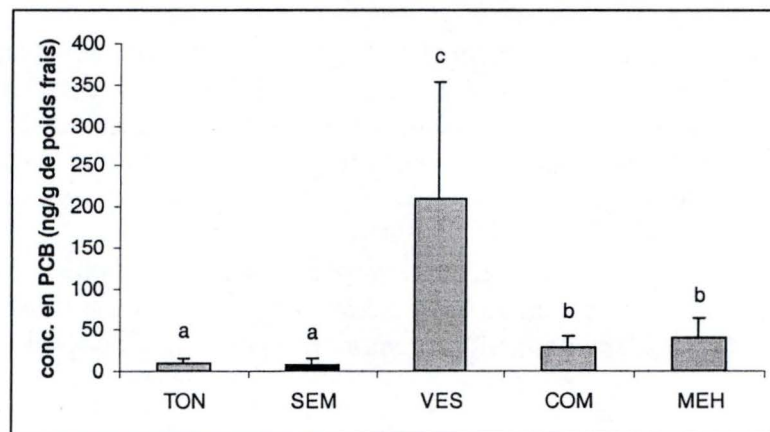


Fig. 31 : Concentration en PCB mesurée dans les muscles de chevaines capturés sur les différents sites. En noir, un des sites choisis comme référence, en gris, sites altérés. Les caractères au dessus de la barre d'erreur indiquent les différences significatives, deux lettres non semblables représentant deux stations significativement différentes.

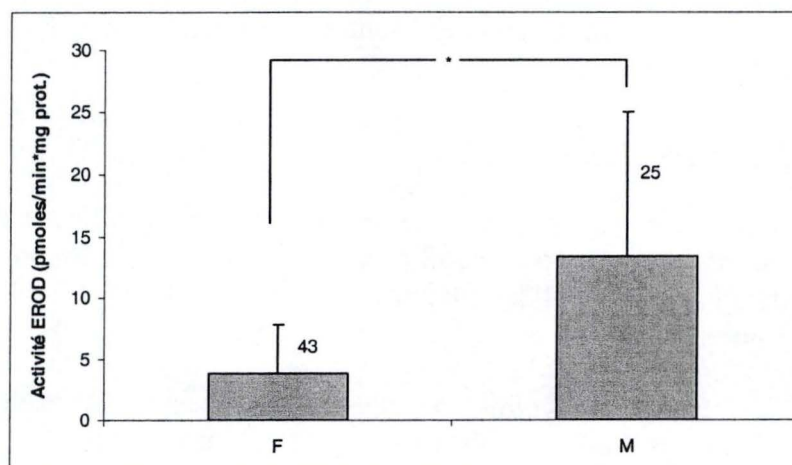


Fig. 32 : Différences d'activité EROD liées au sexe des individus. Les nombres à droite des barres d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés pour chaque station. \* = différence significative ( $p < 0,05$ ).

la station de l'Ourthe à Comblain-la-tour et les stations de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont et du Ton à Lamorteau (fig. 30).

L'ANOVA menée sur les mâles ne montre aucune différence significative entre les stations ( $p > 0,05$ ).

Les résultats des indices de condition sont donnés à l'annexe 5.

## **2. Indicateurs biochimiques de l'exposition**

### **2.1. Concentration en PCB dans les muscles de chevaines**

Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif, étant donné que d'autres polluants présents dans les différentes stations peuvent influencer les indicateurs biologiques étudiés.

Les valeurs moyennes obtenues varient de 8,4 ng/g de poids frais (Semois à Chiny) à 210 ng/g de poids frais (Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont).

Un test de Brown-Forsythe non significatif permet de satisfaire à la propriété d'homogénéité des variances. L'ANOVA ne détecte pas de différence significative entre les sexes ( $p > 0,05$ ).

Entre les différentes stations, le test de Levene a pu montrer l'homogénéité des variances sur des données transformées par la relation  $y = \log(x+1)$ . L'ANOVA détecte ensuite clairement des différences significatives entre les différentes stations ( $p < 0,001$ ). Un test de comparaison post-hoc HSD pour échantillons à effectifs inégaux permet finalement de différencier significativement toutes les stations entre elles à l'exception du Ton à Lamorteau et de la Semois à Chiny ainsi que l'Ourthe à Comblain-la-tour et la Mehaigne à Wanze (fig. 31).

Les résultats des dosages sont repris en annexe 6.

### **2.2. Activité EROD**

La figure 28 montre les résultats obtenus pour les activités EROD mesurées chez les chevaines capturés sur les différents sites.

Les valeurs observées pour les différents sites étudiés sont comprises entre 2,2 pmoles/min/mg de protéines (Semois à Chiny) et 15,2 pmoles/min/mg de protéines (Mehaigne à Wanze).

La littérature mentionne souvent l'aspect sexe-dépendant des niveaux d'activité EROD observés, les individus femelles possédant des activités EROD plus faibles et surtout beaucoup plus variables que les mâles. Ceci est observé dans le présent travail (fig. 32). Les valeurs observées sont en moyenne de 3,9 pmoles/min/mg protéines chez les femelles et de 13,3 pmoles/min/mg protéines chez les mâles.

En ce qui concerne les valeurs d'activité EROD pour les différentes stations, L'analyse de la variance signale clairement l'existence de différences significatives entre les



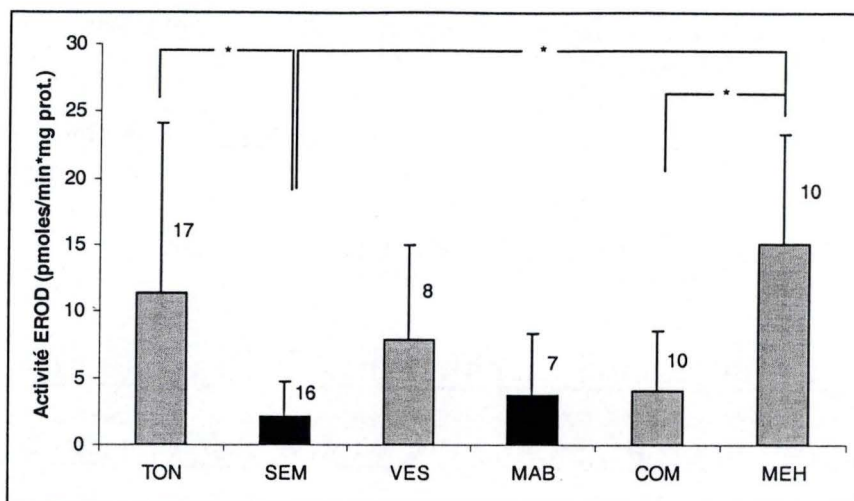


Fig. 33 : Activité EROD mesurée sur des chevaines capturés sur les différents sites échantillonnés. En noir, les sites choisis comme références ; en gris, les sites altérés. Les nombres à droite des barres d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés pour chaque station. \* = différence significative ( $p < 0,05$ ).

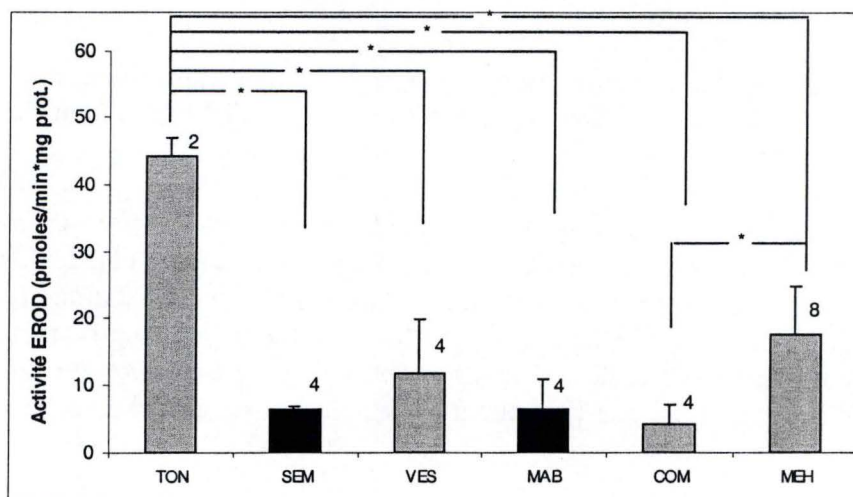


Fig. 34 : Activité EROD mesurée sur des chevaines mâles capturés sur les différents sites échantillonnés. En noir, les sites choisis comme références ; en gris, les sites altérés. Les nombres à droite des barres d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés pour chaque station. \* = différence significative ( $p < 0,05$ ).

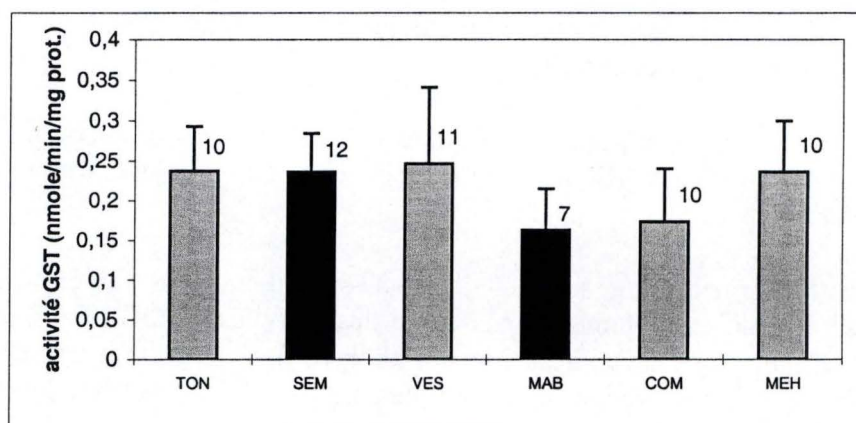


Fig. 35 : Activité GST mesurée sur des chevaines capturés sur les différents sites échantillonnés. En noir, les sites choisis comme références ; en gris, les sites altérés. Les nombres à droite de la barre d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés pour chaque station.

activités EROD mesurées sur les différentes stations ( $p < 0,001$ ). Un test de comparaison post-hoc HSD pour échantillons à effectifs différents nous permet de constater que les chevaines de la Mehaigne à Wanze possèdent une activité EROD significativement plus élevée que celle des individus de la Semois à Chiny et de l'Ourthe à Comblain-la-tour. Les chevaines du Ton à Lamorteau possèdent également une activité EROD significativement plus élevée de celle des individus de la Semois à Chiny (fig 33).

Pour nous affranchir de la variabilité liée au sexe des individus, nous avons suivi la suggestion faite par Monod (1997) qui consiste à ne comparer que les individus mâles entre eux.

Les valeurs observées sont comprises entre 4,3 pmoles/min/mg protéines pour les chevaines de Comblain-la-tour et 44,3 pour les individus du Ton à Lamorteau. La figure 34 montre les activités EROD mesurées chez les chevaines mâles capturés sur les différents sites. Le test de Levene montre l'homogénéité des variances et l'ANOVA conclue à l'existence de différences significatives entre les valeurs d'activités EROD des chevaines mâles des différentes stations ( $p < 0,001$ ). Le test de comparaison post-hoc HSD pour échantillons à effectifs différents permet d'affirmer que les chevaines mâles du Ton à Lamorteau possèdent des activités EROD significativement différentes de celles des individus mâles de tous les autres sites. L'activité EROD des individus mâles de la Mehaigne à Wanze diffèrent significativement de celle des chevaines mâles de l'Ourthe à Comblain-la-tour.

En conclusion, nous pouvons considérer que l'analyse des activités EROD sur les chevaines des différentes stations nous a permis d'isoler les stations du Ton à Lamorteau et de la Mehaigne à Wanze comme étant des sites où les chevaines possèdent globalement une activité EROD supérieure à celle mesurée sur les sites de référence. La Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont et l'Ourthe à Comblain-la-tour, stations considérées au départ comme altérées, ne montrent pas de différence significative d'activité EROD avec les stations de référence. L'Ourthe à Comblain-la-tour montre même des valeurs d'activité EROD significativement plus faibles que sur les stations du Ton à Lamorteau et de la Mehaigne à Wanze.

Notons enfin que le nombre parfois peu élevé d'individus étudiés par station doit être pris en compte pour nuancer la fiabilité des analyses statistiques. Ainsi, le Ton à Lamorteau et l'Ourthe en amont de Maboge ne comptent respectivement que 2 et 3 individus mâles. Des écarts-types relativement faibles, confirmant la faible variabilité de l'activité EROD des mâles permettent, faute de mieux, de poursuivre les analyses.

Les résultats des dosages sont donnés à l'annexe 7.

### **2.3. Activité GST**

Les résultats des activités GST mesurées sur les chevaines capturés sur les différents sites sont présentés à la figure 35.

Les valeurs varient entre 0,16 nmoles/min/mg protéines pour les individus de l'Ourthe en amont de Maboge et 0,25 nmoles/min/mg protéines chez les chevaines de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont.

Un test de Levene sur les valeurs d'activité GST révèle l'homogénéité des variances, permettant de poursuivre les analyses sans recourir à une transformation des données. Aucune



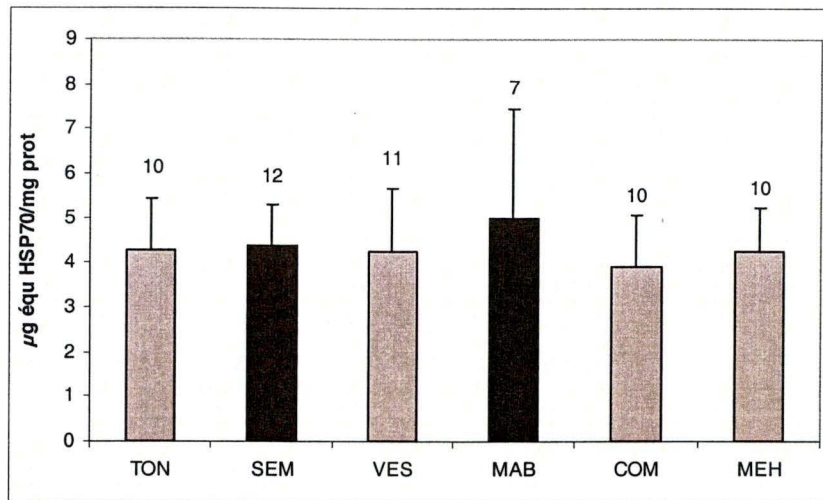


Fig. 36 : Concentration en HSP70 mesurée sur des chevaines capturés sur les différents sites échantillonnés. En noir, les stations de référence ; en gris, les sites altérés. Les nombres au dessus des barres d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés.

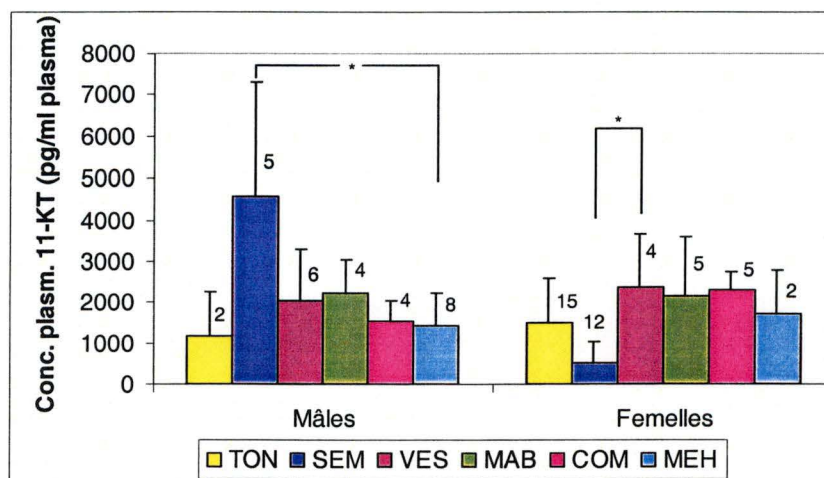


Fig. 37 : Concentration plasmatique en 11-KT mesurée chez les chevaines pêchés sur les différents sites. Les nombres à côté des barres d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés. \* = différence significative ( $p < 0,05$ ).

différence n'ayant été détectée entre l'activité GST des individus mâles et celle des individus femelles ( $p > 0,05$ ), les données ont été traitées sans distinction au niveau du sexe.

Bien que l'ANOVA suggère un effet « station » influant sur l'activité GST des chevaines ( $p < 0,05$ ), le test de comparaison post-hoc HSD pour échantillons à effectifs différents ne met en évidence aucune différence significative d'activité entre les différentes stations.

Notons cependant que les deux sites de l'Ourthe (amont de Maboge et Comblain-la-tour) semblent montrer des activités GST moins importantes, sans qu'il existe pour autant de différence significative entre l'activité GST des chevaines de ces stations et celle des individus capturés sur les autres cours d'eau.

L'annexe 8 reprend les résultats de ces dosages.

## **2.4. Protéines de stress HSP70**

La figure 36 présente les résultats obtenus pour les mesures de concentrations en protéines de stress HSP70. Les valeurs observées pour le niveau de HSP70 sont comprises entre 3,9  $\mu\text{g}$  éq. HSP70/mg protéines (Ourthe à Comblain-la-tour) et 5  $\mu\text{g}$  éq. HSP70/mg protéines (Ourthe en amont de Maboge). Le test de Levene souligne l'homogénéité des variances. Aucune différence significative entre les sexes n'a été démontrée lors de l'ANOVA ( $p > 0,05$ ). L'analyse de la variance ne permet pas d'établir l'existence de différences significatives entre les concentrations en HSP70 mesurées chez les chevaines capturés sur les différentes stations ( $p > 0,05$ ).

Les résultats des dosages se trouvent en annexe 9.

## **3. Concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels**

### **3.1. 11-kétotestostérone (11-KT)** (fig. 37)

Pour les individus mâles, les valeurs obtenues sont en moyenne de 2,2 ng/ml de plasma. Elles varient entre 1,2 ng/ml de plasma (Ton à Lamorteau) à 4,6 ng/ml de plasma (Semois à Chiny). Le test de Levene démontre l'homogénéité des variances. L'ANOVA signale l'existence de différences significatives dans les taux plasmatiques de 11-KT mesurés chez les chevaines capturés sur les différents sites ( $p < 0,01$ ). Un test de comparaison post-hoc HSD pour échantillons à effectifs différents montre enfin une différence significative entre les stations de la Semois à Chiny et de la Mehaigne à Wanze.

En ce qui concerne les femelles, les valeurs obtenues sont en moyenne de 1,5 ng/ml de plasma. Elles sont comprises entre 0,5 ng/ml de plasma (Semois à Chiny) et 2,4 ng/ml de plasma (Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont). Le test de Levene parvient à prouver l'homogénéité des variances. L'ANOVA signale une différence significative entre les différentes stations sur base de ce paramètre ( $p < 0,01$ ). Le test de comparaison post-hoc pour échantillons à effectifs inégaux montre que les valeurs de la Semois à Chiny sont significativement plus faibles que celles de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont.



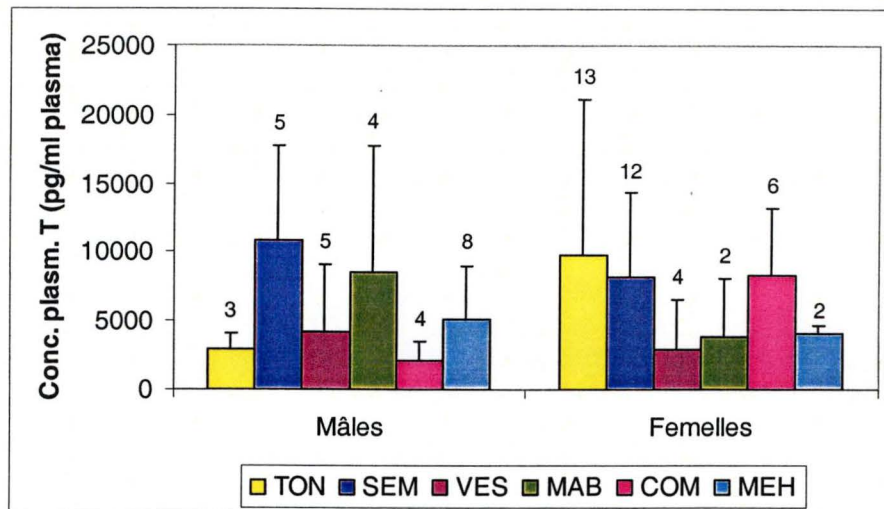


Fig. 38 : Concentration plasmatique en T mesurée chez les chevaines pêchés sur les différents sites. Les nombres au dessus des barres d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés.

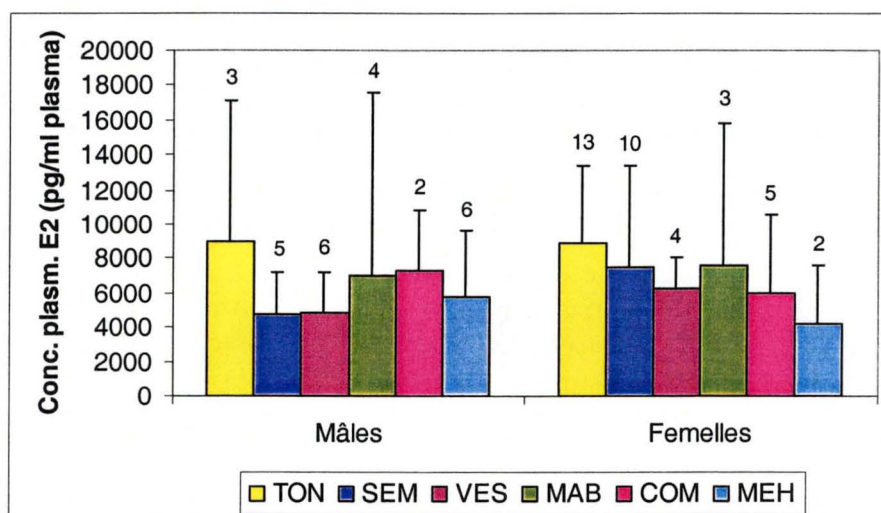


Fig. 39 : Concentration plasmatique en E2 mesurée chez les chevaines pêchés sur les différents sites. Les nombres au dessus des barres d'erreur représentent le nombre d'individus étudiés.

### **3.2. Testostérone (T)** (fig. 38)

Les valeurs obtenues sont plus élevées, en moyenne 5,8 ng/ml de plasma chez les mâles et 7,8 ng/ml de plasma chez les femelles. Pour les mâles comme pour les femelles, les test de Levene prouvent l'homogénéité des variances. Cependant, et ce pour les deux sexes, l'ANOVA ne montre aucune différence significative entre les stations sur base de la concentration plasmatique en T ( $p > 0,05$ ).

### **3.3. 17 $\beta$ -Oestradiol (E2)** (fig. 39)

Les valeurs observées sont en moyenne de 6,1 ng/ml de plasma chez les mâles et de 7,5 ng/ml de plasma chez les femelles. Chez les mâles, le test de Brown-Forsythe prouve l'homogénéité des variances. Pour les femelles, le test de Levene s'est révélé suffisant pour montrer cette propriété. Cependant, l'ANOVA ne montre de différence significative entre les stations sur base de la concentration plasmatique en E2 pour aucun des sexes ( $p > 0,05$ ).

Remarquons que le nombre parfois peu élevé d'individus étudiés par station doit nuancer les résultats obtenus, en effet la variabilité inter-individuelle est souvent importante étant donné l'aspect pulsatile de l'émission des stéroïdes sexuels dans le sang.

Les résultats des dosages de stéroïdes sont repris à l'annexe 10.

## **4. Etude des populations de chevaines**

Les histogrammes de fréquence – taille pour les différentes stations sont présentés à la figure 40. Le site de l'Ourthe à Comblain-la-tour n'est pas pris en compte pour l'analyse des populations de chevaines vu le faible nombre de chevaines (2) capturés lors des deux passages sur le bief de 100 m. L'explication peut venir du fait que les chevaines étaient en période de frai à ce moment et qu'ils se concentraient sur les zones frayères, hypothèse confirmée par le nombre important de chevaines capturés sous le pont de Comblain-la-tour lors de la recherche d'individus pour les prélèvements. En plus d'un endroit de frai, le pont semblait également servir de zone de refuge aux différentes espèces.

Les histogrammes ne montrent pas le détail de la plus jeune des classes de taille (45 – 95 mm). Ceci est dû au traitement par lot de tous les petits individus lors du travail de biométrie sur le terrain.

Au cours de la réalisation de sa thèse de doctorat, Kosmala (1998) étudia la structure de taille de plusieurs populations de chevaines capturés durant la même période que lors du présent travail. L'âge des individus n'ayant pas été déterminé, elle considéra les individus de taille inférieure à 130 mm comme appartenant au groupe 1+, soit les individus les plus jeunes.

En considérant les individus de taille inférieure à 135 mm dans la structure de tailles obtenue pour chaque station, on observe un pic pour les sites de la Semois à Chiny, de l'Ourthe en amont de Maboge et de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont. Le Ton à Lamorteau et la Mehaigne à Wanze n'abritent que très peu d'individus de taille inférieure à 135 mm (6 pour chacune des stations). Par contre, ces deux stations montrent un nombre important de chevaines pour les classes de tailles moyennes. Ces classes de tailles intermédiaires étant par



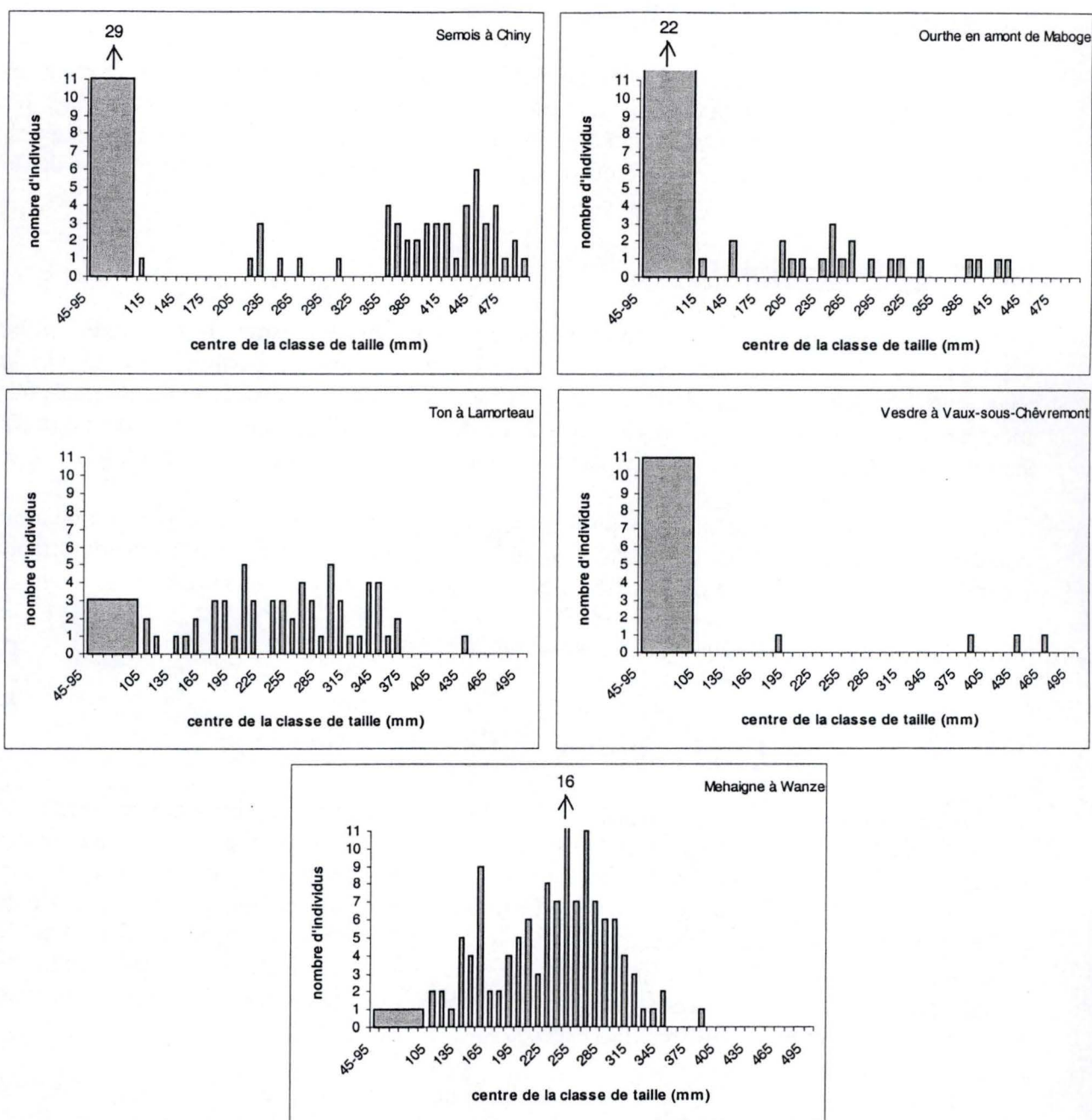


Fig. 40 : Histogrammes fréquence – taille pour les populations de chevaines capturés sur les différents sites.

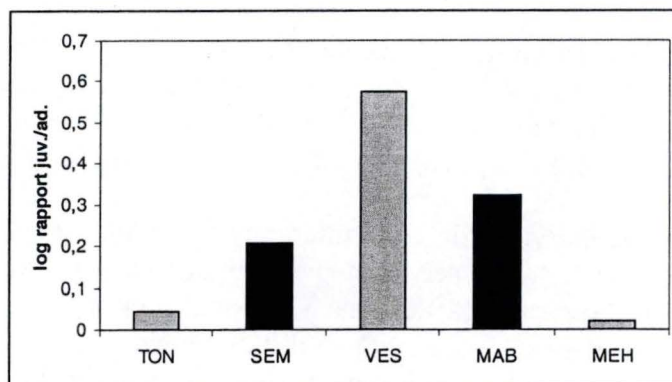


Fig. 41 : Rapport juvéniles/adultes calculé pour les populations de chevaines des différents sites échantillonnés. En noir, les sites choisis comme références ; en gris, les sites altérés.

ailleurs peu représentées sur les trois autres sites. Enfin, notons que la station de la Semois à Chiny abrite un nombre important de gros individus.

La figure 41 montre les valeurs obtenues pour les rapports « juvéniles/adultes » calculés pour les populations de chevaines des différentes stations. On distingue clairement les stations du Ton à Lamorteau et de la Mehaigne à Wanze dont les valeurs faibles indiquent un nombre peu élevé de jeunes individus.

En bref, nous remarquons surtout une distribution équilibrée avec beaucoup de jeunes puis des individus de taille croissante sur les sites de référence (Semois à Chiny et Ourthe en amont de Maboge), et une structure relativement perturbée pour les stations du Ton à Lamorteau et de la Mehaigne à Wanze (stades jeunes peu représentés) ainsi que pour le site de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont (peu d'individus, presque exclusivement des juvéniles).

## **5. Etude des communautés ichthyologiques**

Dans cette partie, nous analyserons tout d'abord la structure **globale** des communautés ichthyologiques avant de nous intéresser plus spécialement à l'étude de certains **descripteurs biologiques** (métriques).

Les différentes stations étant réparties dans deux zones piscicoles différentes, nous les séparerons pour l'étude de certaines métriques par soucis de représentativité lors de la comparaison.

### **5.1. Structure globale des peuplements ichthyologiques**

Sur base de la biomasse totale échantillonnée et de l'allure générale des histogrammes, nous pouvons clairement séparer les stations suivant la zone piscicole pour l'analyse globale des peuplements. En zone à barbeau, nous retrouvons les sites du Ton à Lamorteau, de la Mehaigne à Wanze et de la Semois à Chiny, site de référence. Les stations classées dans la zone à ombre sont la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont, l'Ourthe à Comblain-la-tour et l'Ourthe en amont de Maboge, site de référence.

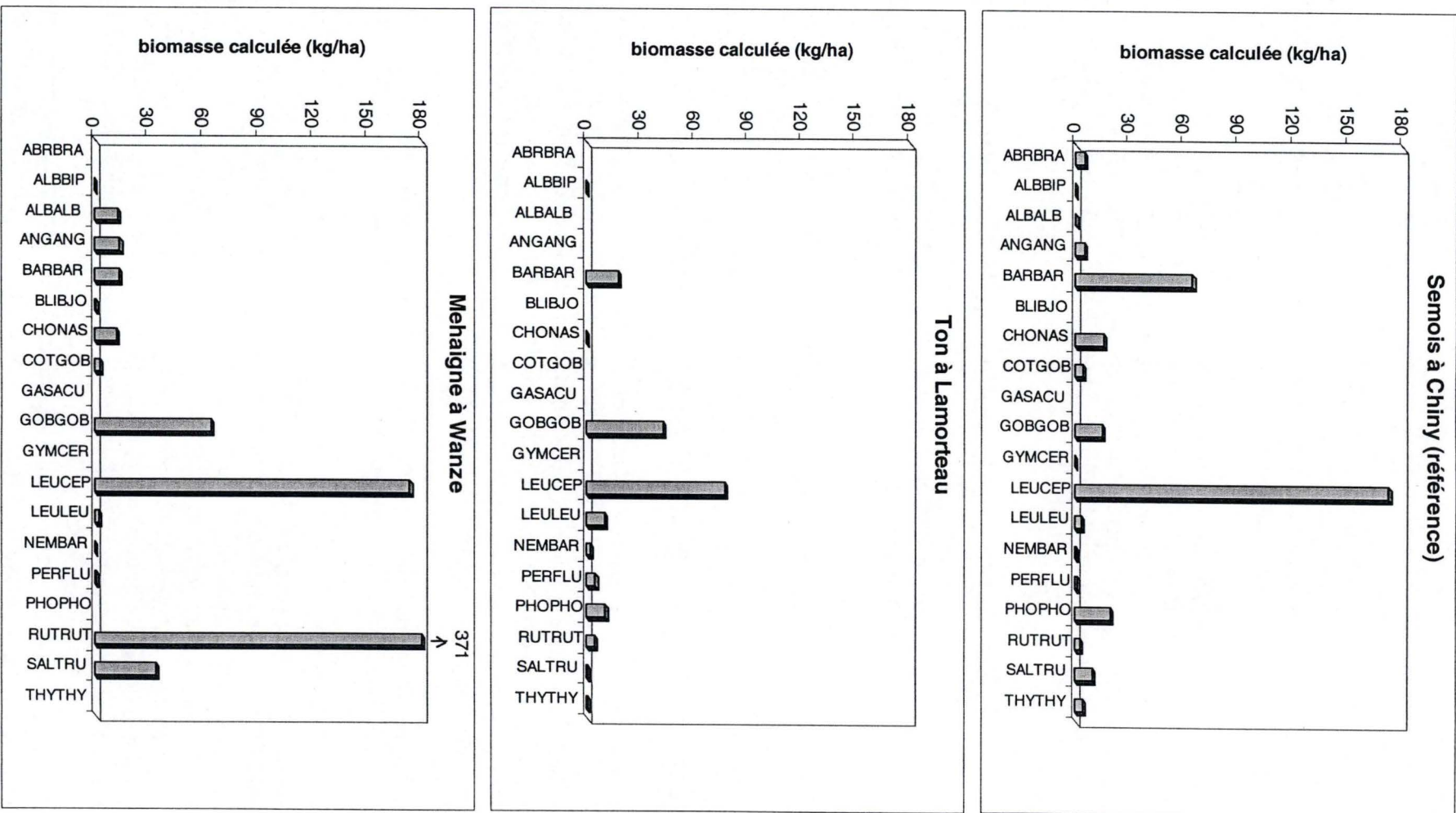
La figure 42 montre la structure par biomasse du peuplement ichthyologique des stations de la zone à barbeau. Les codes utilisés pour décrire chaque espèce sont repris dans le tableau 13.

On constate que le peuplement de la Semois (référence) est dominé par les cyprinidés rhéophiles (77,8%) dont le chevaine (52%), le barbeau (19,6%), le hotu (4,9%) et la vandoise (1,3%). Les salmonidés (truite fario et ombre) ne représentent que 4,6% de la biomasse. Les espèces d'accompagnement (chabot, ablette spiralin, loche franche, vairon, goujon (4,7%) et grémille) représentent 12,6% de la biomasse totale. Les carnassiers (perche et anguille) et les cyprinidés d'eau calme (brème commune, gardon et ablette commune) complètent l'ichtyocénose avec respectivement 2,2% et 2,8%. La biomasse totale atteint 331,7 kg/ha.

Le site du Ton à Lamorteau montre globalement une structure similaire, cependant, le barbeau semble régresser puisqu'il ne représente plus que 10,1% de la biomasse totale (172,7 kg/ha). Les salmonidés montrent une forte diminution et ne sont plus représentés que par la truite (un seul individu et 1,2% de la biomasse). Les espèces d'accompagnement représentent



Fig. 42 : Répartition par biomasse des peuplements ichthyologiques pour les stations de la zone à barbeau.



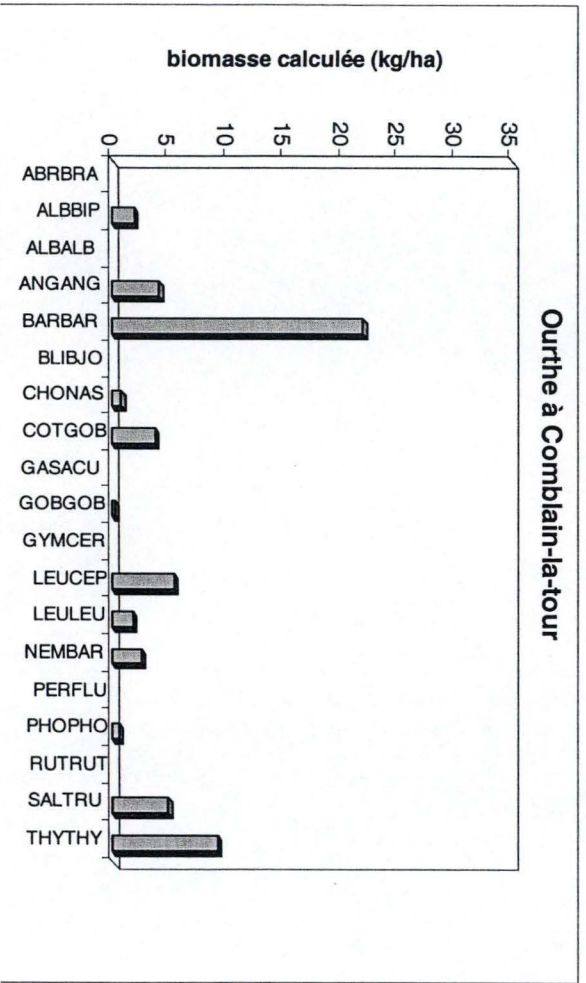
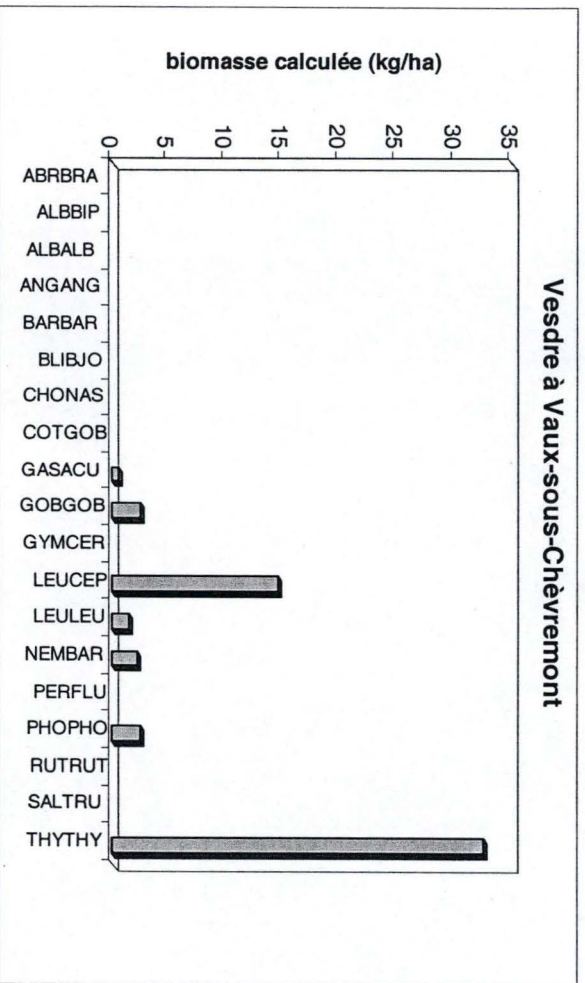
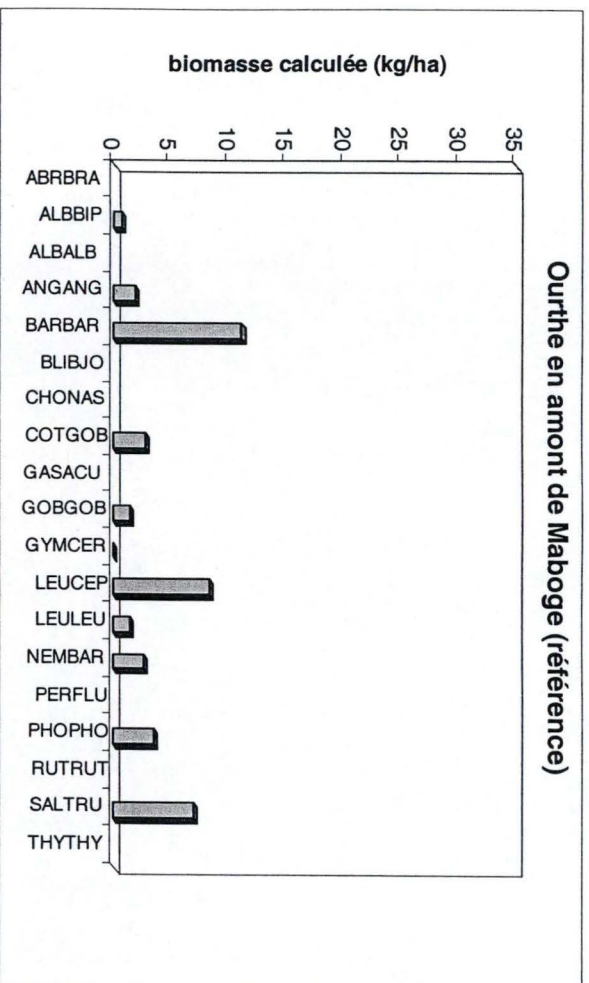


Fig. 43 : Répartition par biomasse des peuplements ichthyologiques pour les stations de la zone à ombre.



32,3% de la biomasse à cause de l'augmentation du goujon (24,6%). Le chabot est absent du site. Les carnassiers ne sont représentés que par la perche (3%).

Le site de la Mehaigne à Wanze montre une biomasse excessivement élevée (703,5 kg/ha). En cause, le gardon qui abonde véritablement avec une biomasse de 370,7 kg/ha (52,7%). Les cyprinidés rhéophiles représentent 28,7% de la biomasse avec une nette dominance du chevine (24,6%) sur le barbeau (2%) et le hotu (1,7%). Les salmonidés ne sont représentés que par la truite (4,8%). Les espèces d'accompagnement (9,5%) sont clairement dominées par le goujon (9%). Les carnassiers (perche et anguille) représentent 2,2% de la biomasse totale.

La structure du peuplement ichthyologique des stations de la zone à ombre est présentée en figure 43. Les codes utilisés pour décrire chaque espèce sont repris dans le tableau 13.

Le peuplement de l'Ourthe en amont de Maboge (référence) est dominé par les cyprinidés rhéophiles (50,7%). Le chevine ne domine cependant plus le barbeau (20,2% contre 26,8%). Les salmonidés, représentés seulement par la truite fario (il convient de noter que des ombres ont été capturés lors de la recherche de chevines supplémentaires pour les prélèvements), représentent quant à eux 16,9% de la biomasse. Les espèces d'accompagnement représentent 27,8% de la biomasse, le goujon ne dépassant pas les 3,7%. Les carnassiers (anguille uniquement) complète le peuplement avec 4,6% de la biomasse totale (41,6 kg/ha).

La station de l'Ourthe à Comblain-la-tour montre une structure de l'ichtyofaune très similaire au site de référence. Les cyprinidés rhéophiles dominent toujours le peuplement (52,2%) et le barbeau (38,1%) dépasse encore plus nettement le chevine (9,5%). Les salmonidés, composés de la truite (8,5%) et de l'ombre (15,9%), sont également bien présents. Les espèces d'accompagnement représentent 16,2% de la biomasse et le goujon ne dépasse pas 0,6%. Les carnassiers ne sont représentés que par l'anguille et atteignent 7,2% de la biomasse totale (57,5 kg/ha).

Enfin, la station de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont montre une ichthyofaune très perturbée. Paradoxalement, c'est l'ombre qui domine le peuplement (57,3%), il s'agit néanmoins d'une population déséquilibrée composée exclusivement d'individus dont la taille variait entre 24 et 28 cm. Les cyprinidés rhéophiles composent 28,6% de la biomasse totale. Le chevine (25,9%) domine la vandoise (2,7%), le barbeau et le hotu étant absents. Les espèces d'accompagnement représentent 14,1% de la biomasse, le goujon atteignant les 4,5% et le chabot étant absent. Notons la présence de l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*), espèce très polluo-tolérante. Aucun carnassier n'a été capturé. La biomasse totale atteint 56,8 kg/ha.

## **5.2. Etude des peuplements à l'aide de descripteurs biologiques**

### **5.2.1. Métrique relative à la diversité : nombre total d'espèces**

La figure 44 représente les valeurs obtenues pour cette métrique par les différentes stations. La diversité ichthyologique d'un site dépendant de la zone piscicole auquel celui-ci est associé, nous séparerons les stations de la zone à barbeau de celles de la zone à ombre. Signalons enfin que la diversité des peuplements n'est considérée ici que sous son aspect quantitatif, l'étude ultérieure d'autres métriques abordant l'aspect qualitatif des peuplements.

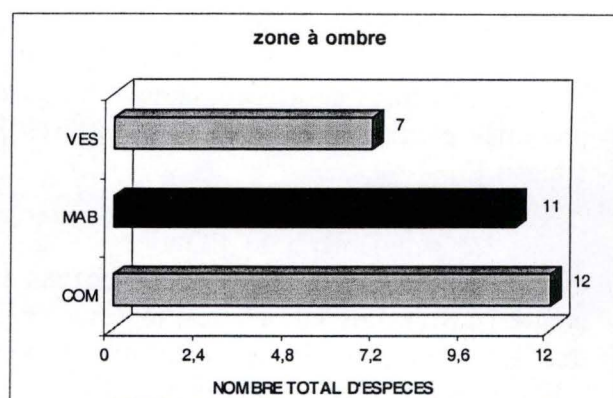
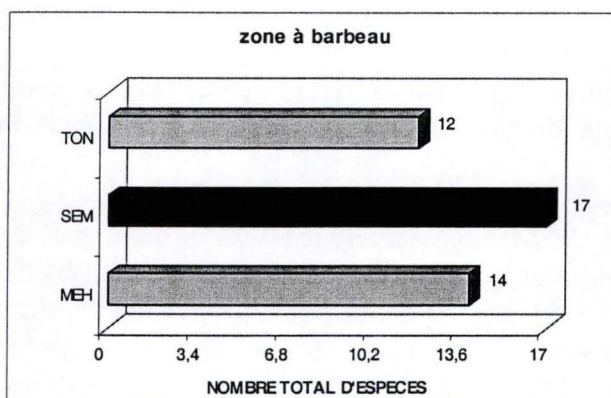


Fig. 44 : Nombre total d'espèces pour les différentes stations échantillonnées. En foncé, les sites choisis comme référence ; en clair, les sites altérés.

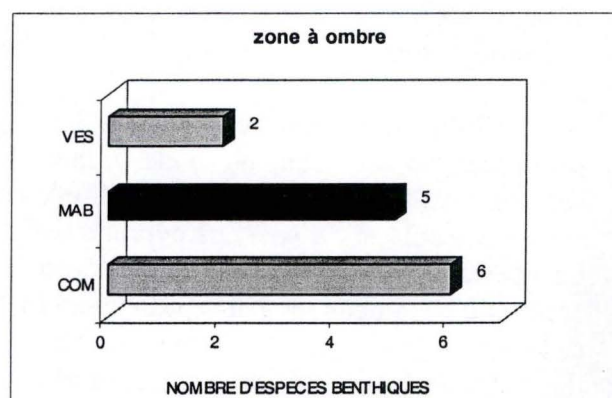
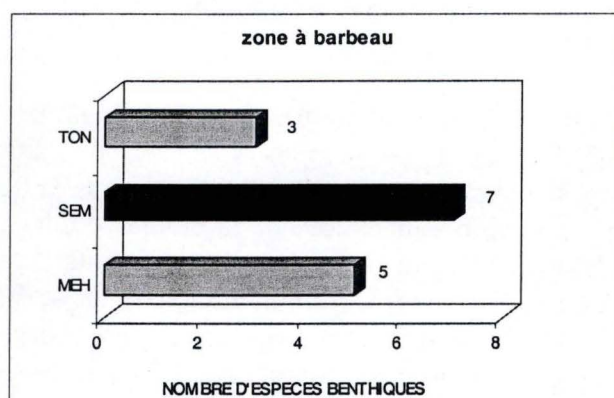


Fig. 45 : Nombre d'espèces benthiques pour les différentes stations échantillonnées. En foncé, les sites choisis comme référence ; en clair, les sites altérés.



Pour les stations de la zone à barbeau, la station de référence, c'est-à-dire la Semois à Chiny, comporte 17 espèces, dont une (brème commune) n'est représentée que par un seul individu. La station du Ton à Lamorteau voit sa diversité ichthyologique chuter à 12 espèces, avec deux espèces représentées par un seul individu (truite fario et hotu). La Mehaigne à Wanze abrite 14 espèces, dont deux ne comptent qu'un seul représentant (barbeau et ablette spirilin).

En ce qui concerne les stations de la zone à ombre, l'Ourthe en amont de Maboge (station de référence) compte 11 espèces, dont deux ne sont représentées que par un seul individu (anguille et grémille). L'Ourthe à Comblain-la-tour comporte 12 espèces dont une (hotu) ne compte qu'un représentant. La Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont possède la plus faible diversité ichthyologique avec 7 espèces, toutes représentées par plus d'un individu.

### **5.2.2. Métriques relatives à l'altération de l'habitat benthique**

#### **5.2.2.1. Nombre d'espèces benthiques**

Pour cette métrique, la séparation des sites en fonction de leur zone piscicole est à nouveau nécessaire. Elle a été utilisée avec succès par Oberdorff *et al.* (2002) lors du développement d'un indice poisson en France. La figure 45 représente les résultats obtenus pour les différentes stations échantillonnées.

En zone à barbeau, la station de référence (Semois à Chiny) compte le plus d'espèces benthiques (7). Le Ton à Lamorteau abrite quant à lui 3 espèces benthiques. La Mehaigne à Wanze possède une valeur intermédiaire de 5 espèces benthiques.

Pour la zone à ombre, l'Ourthe en amont de Maboge compte 5 espèces benthiques. L'Ourthe à Comblain-la-tour se situe dans les mêmes valeurs avec 6 espèces benthiques. La Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont voit sa diversité ichthyologique benthique chuter à 2 espèces.

#### **5.2.2.2. Rapport chabot / loche**

Pour cette métrique, la séparation suivant la zone piscicole n'est plus nécessaire, la valeur de la métrique consistant en un rapport. Les résultats pour cette métrique sont donnés à la figure 46.

Deux stations semblent particulièrement affectées pour ce paramètre : le Ton à Lamorteau et la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont, où le chabot est absent. La valeur élevée de ce rapport pour le site de la Mehaigne semble du non pas à une présence importante du chabot (seul 26 individus ont été capturés), mais à une quasi absence de la loche (3 individus). Les valeurs obtenues pour cette métrique restent cependant à nuancer par la faible probabilité de capture généralement rencontrée pour ces deux espèces, spécialement pour les stations à courant soutenu (dont la Mehaigne).

#### **5.2.2.3. Rapport biomasse barbeau / biomasse goujon**

Cette métrique a pour but de mettre en évidence la tendance observée du remplacement du barbeau par le goujon sur les sites altérés. Les résultats sont présentés en figure 47.

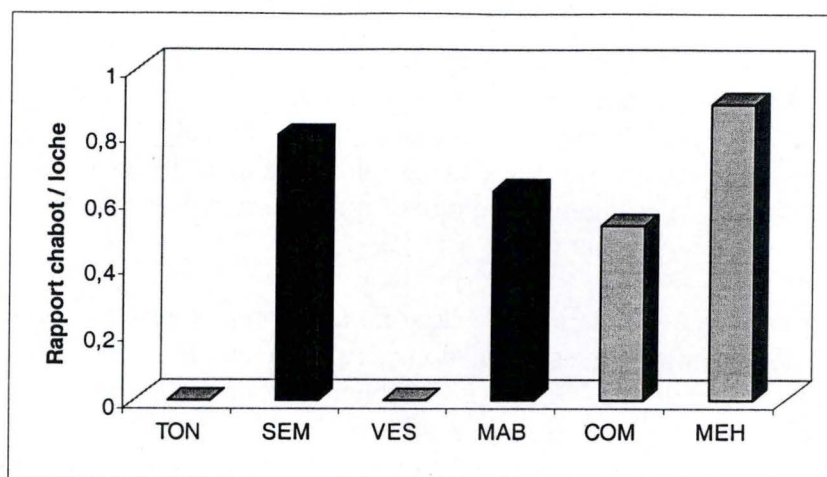


Fig. 46 : Rapport chabot / loche calculé pour les différentes stations. En foncé, les sites choisis comme référence ; en clair, les sites altérés.

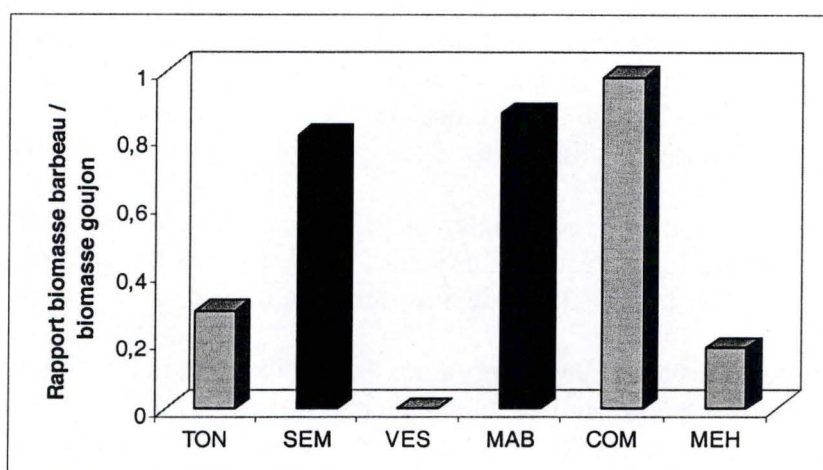


Fig. 47 : Rapport biomasse barbeau / biomasse goujon calculé pour les différentes stations. En foncé, les sites choisis comme référence ; en clair, les sites altérés.

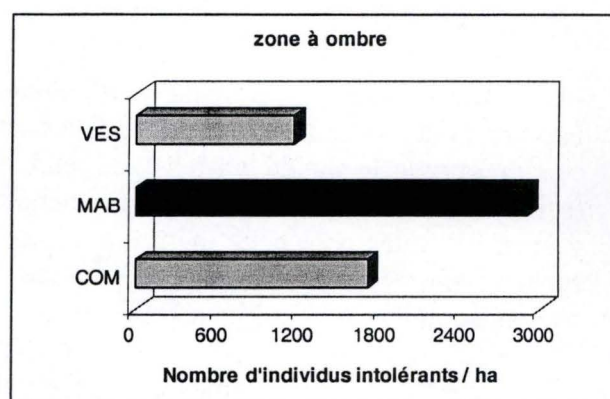
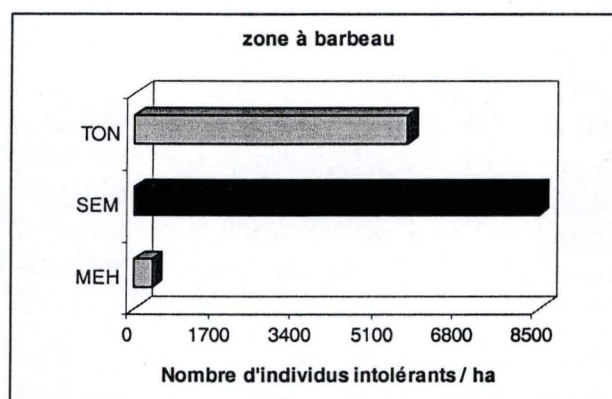


Fig. 48 : Nombre d'individus intolérants pour les différentes stations échantillonnées. En foncé, les sites choisis comme référence ; en clair, les sites altérés.



Trois stations montrent des valeurs faibles pour ce rapport : le Ton à Lamorteau, la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont et la Mehaigne à Wanze.

### **5.2.3. Métrique relative à la sensibilité à la qualité de l'eau : nombre d'individus intolérants**

Utilisée par Oberdorff *et al.* (2002) lors du développement de l'indice ichtyologique en France. Pour cette métrique, il est nécessaire de séparer les sites selon la zone piscicole étant donné les différences de densité observées. Les résultats sont présentés en figure 48.

Pour la zone à barbeau, le site de référence (Semois à Chiny) atteint la plus haute valeur (8489 individus intolérants/ha). La valeur la plus faible est obtenue par le site de la Mehaigne à Wanze (371 individus intolérants/ha). Le Ton à Lamorteau obtient une valeur intermédiaire de 5703 individus intolérants/ha.

En zone à ombre, la valeur la plus importante est atteinte par le site de référence (Ourthe en amont de Maboge, 2897 individus intolérants/ha). L'Ourthe à Comblain-la-tour obtient une valeur de 1701 individus intolérants/ha. La valeur la plus faible est obtenue par la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont (1157 individus intolérants/ha).

## DISCUSSION



La discussion des résultats suivra le canevas suivant : d'abord, nous discuterons point par point les différents paramètres étudiés. Dans un deuxième temps, nous tenterons d'adopter une approche holistique en intégrant les différents niveaux d'organisation biologique et en dégagant les grandes tendances observées. Ensuite nous traiterons du conflit entre fidélité et mobilité qui apparaît lorsque l'on utilise les poissons comme organismes indicateurs. Enfin, nous discuterons des aspects plus méthodologiques liés à cette étude.

### Paramètres morphologiques et condition globale

Les valeurs observées (entre 1,0 et 1,2) sont semblables à celles constatées par Kosmala (1998) lorsqu'elle étudiait l'effet de rejets de station d'épuration sur ce paramètre chez le chevin. La différence que nous observons entre le facteur de condition moyen des chevains de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont et celui des chevains de l'Ourthe en amont de Maboge s'explique difficilement. Kosmala (1998) mentionnait que certains auteurs avaient pu mettre en évidence une augmentation du K chez des poissons exposés à des rejets industriels sans que les mécanismes physiologiques sous-jacents ne soient connus. Elle signalait d'ailleurs que le K était plus indicateur d'un effet biotique ou physique (nourriture, température) qu'un outil adapté à la détection d'une perturbation chimique.

Les différences entre sexes observées pour les valeurs de RHS peuvent s'expliquer par l'état de maturation des individus. Cette hypothèse considère que l'activité de synthèse protéique dans le foie des femelles est augmentée en période de vitellogenèse. Nos échantillonnages se sont déroulés en fin de période de maturation sexuelle et durant de la période de ponte. La synthèse d'une protéine de réserve, la vitellogénine, par le foie est destinée à fournir des réserves nutritives au jeune embryon tandis que les choriogénines, elles aussi synthétisées par le foie sont des protéines membranaires de l'œuf. Cette synthèse protéique nécessite le développement d'organites à l'intérieur des cellules. Dans ce cas, la prolifération de réticulum endoplasmique et d'autres structures comme les appareils de Golgi s'observe dans les cellules hépatiques, ce qui entraîne un accroissement du poids du foie (Rinchard *et al.*, 1998). Nous avons clairement observé des différences de taille entre les foies prélevés sur les chevains femelles et ceux issus d'individus mâles. Ces différences se marquant aussi dans les rapports hépato-somatiques. Cependant, les RHS observés chez les femelles montrent probablement des valeurs en cours de diminution. En effet, en fin de maturation sexuelle et au moment de la ponte, l'activité vitellogénique du foie diminue en réponse à la chute de la concentration plasmatique en  $17\beta$ -oestradiol. Le fait de n'observer aucune différence entre les RHS des chevains capturés sur les différents sites suggère que la structure du tissu hépatique ne subit pas de grave altération ou de perte d'intégrité. Ceci pourrait néanmoins être vérifié par une étude histologique du foie, procédé utilisé avec succès par Hugla *et al.* (1995) pour mettre en évidence l'effet des PCB chez des barbeaux capturés dans la Meuse.

Les valeurs de RGS observées chez les chevains femelles sont proches de celles observées par Rinchard & Kestemont (1996) chez le gardon en fin de vitellogenèse et au début de la période de ponte. Le chevin et le gardon sont tous deux des pondeurs uniques groupes synchrones, ce qui signifie qu'ils ne se reproduisent qu'une fois l'an et que leurs ovaires sont constitués d'au moins deux cohortes d'ovocytes, une seule servant à la ponte de l'année. Cette observation confirme que nos échantillonnages ont bien eu lieu juste avant la période de ponte, voire au début de celle-ci. Les différences observées entre les RGS des chevains femelles capturés sur les différents sites sont probablement dues au fait que certaines populations de chevains se trouvaient peut-être déjà en début de période de ponte



alors que d'autres étaient toujours au stade de maturation finale. Les femelles de Comblain-la-tour, qui ont du, pour des raisons techniques, être transportées vivantes durant un court trajet ont certainement été soumises à un stress. Ce stress aurait vraisemblablement provoqué l'expulsion des œufs dans le bassin de transport. Le fait de n'observer aucune différence significative entre les valeurs de RGS chez les individus mâles capturés sur les différentes stations suggère que les testicules des chevaines ne sont pas sujets à de profondes altérations de structure. Une étude histologique des gonades pourrait éventuellement confirmer cette hypothèse.

Remarquons que même si ce paramètre n'a pas été systématiquement relevé, nous avons constaté qu'un nombre important de poissons (pas seulement les chevaines) de la station du Ton à Lamorteau montraient un état de santé général altéré. Nous avons pu observer des lésions cutanées parfois très importantes sur le corps de plusieurs individus, certains possédant des opercules atrophiés ou des nageoires fortement déchiquetées, parfois réduites à de simples moignons (chez les chevaines surtout). Enfin, certains chevaines étaient parasités au niveau des intestins et du foie par des vers d'aspect filiforme. Ces parasites ont également été observés chez certains individus de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont.

#### Indicateurs biochimiques de l'exposition

Nous avons remarqué une différence liée au sexe entre les niveaux d'activité EROD observés chez les chevaines prélevés sur les différentes stations. Masfaraud *et al.* (1990, cité dans Flammarion *et al.*, 1998) et Vindimian *et al.* (1991) mentionnaient eux aussi une différence d'activité EROD liée au sexe. L'hypothèse avancée serait une influence des stéroïdes sexuels (et particulièrement l'E2) sur l'activité des monooxygénases hépatiques (Adams *et al.*, 1996 ; Janssen *et al.*, 1997 ; Kime, 1999) sans que les mécanismes sous-jacents ne soient réellement connus (Janz *et al.*, 1997). La régression linéaire établie entre l'activité EROD et les concentrations en PCB conduit à un  $r^2$  très faible (0,11 pour des valeurs transformées en logarithmes). Ceci prouve que les PCB ne sont pas les seuls inducteurs possibles et qu'il existe dans certains sites d'autres polluants inducteurs de l'EROD. Dans leur étude de l'induction de l'EROD chez trois espèces de cyprinidés, Vindimian *et al.* (1991) signalaient que l'activité des chevaines vivant sur les sites de référence était en moyenne de 7 pmoles/min/mg de protéines. L'analyse par sexes confondus et l'étude des activités enregistrées chez les individus mâles permettaient de distinguer deux stations : Le Ton à Lamorteau et la Mehaigne à Wanze. Seules les activités EROD mesurées chez les chevaines de ces deux sites dépassaient assez largement les 7 pmoles/min/mg de protéines. Les valeurs importantes observées chez les chevaines du Ton à Lamorteau malgré de faibles concentrations musculaires en PCB (en moyenne 10,5 ng/g de poids frais) sont confirmées par les résultats des travaux de Soimasuo *et al.* (1995) et de Coakley *et al.* (2001) qui soulignaient le potentiel inducteur de l'EROD des effluents d'usines papetières. Des activités agricoles intensives et l'industrie sucrière peuvent être à l'origine des valeurs EROD élevées chez les chevaines de la Mehaigne à Wanze. Parmi les inducteurs probables de l'EROD, on compte les PCB (les valeurs mesurées dans les muscles des chevaines de cette station avoisinant les 40 ng/g de poids frais), ainsi que les pesticides, probablement largement utilisés dans cette région à forte activité agricole. Notons que l'activité EROD des chevaines de l'Ourthe à Comblain-la-tour reste très faible alors que les concentrations musculaires en PCB (en moyenne 29,8 ng/g de poids frais) sont significativement plus importantes que dans les deux sites de référence. Des valeurs élevées (plus de 375 ng/g de poids frais) avaient été observées antérieurement chez des anguilles capturées sur cette station (Thomé, communication personnelle). Enfin, remarquons que malgré les importantes concentrations en PCB dans les



muscles des chevaines de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont (en moyenne 210,4 ng/g de poids frais), l'activité EROD n'est pas significativement plus importante que les activités observées sur les deux sites de référence. Cela pourrait être du à la présence de composés inhibiteurs des monooxygénases hépatiques comme les résines acides (Adams *et al.*, 1996) ou plus vraisemblablement les métaux (Kosmala, 1998). Philippart & Vranken (1983) soulignaient déjà que la Vesdre était soumise à une pollution par les métaux lourds. Une pollution par l'aluminium survenue plus récemment (9 septembre 2002) renforce cette hypothèse (Chermanne, 2002). Cela confirmerait le faible  $r^2$  obtenu lors de la régression linéaire entre l'activité EROD et les concentrations musculaires en PCB mesurées chez les chevaines capturés dans les différentes stations.

Comme plusieurs auteurs l'ont remarqué lors de différents travaux (Soimasuo *et al.*, 1995 ; Behrens & Segner, 2001), les activités GST mesurées sur les chevaines capturés sur les différents sites ne permettent pas de discriminer les stations entre elles. Ce biomarqueur a d'ailleurs connu des succès mitigés lors de son utilisation comme indicateur de l'exposition à un xénobiotique ou à une pollution environnementale (van der Oost *et al.*, 2003).

Il en va de même pour la concentration en HSP70 hépatiques. Les valeurs observées ne différant pas significativement d'un site à l'autre. Deux hypothèses peuvent être avancées sur base des résultats obtenus. Nous pouvons d'abord imaginer que le stress environnemental auquel les chevaines des différentes stations sont soumis n'est pas suffisant pour provoquer une dénaturation protéique qui nécessiterait la synthèse de HSP70 pour maintenir l'intégrité physiologique des organismes. La seconde hypothèse que nous pouvons émettre est que les chevaines des sites altérés sont peut-être acclimatés à ce stress. La mise en place de mécanismes de protection, d'élimination ou de métabolisation pourraient dans ce cas dispenser les poissons d'élaborer d'autres mécanismes de défense comme la synthèse de HSP70. Des tests en laboratoire seraient utiles pour vérifier ces deux hypothèses.

#### Concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels

Les concentrations en 11-KT mesurées chez les mâles (en moyenne 2,2 ng/ml de plasma) et celles mesurées chez les femelles (en moyenne 1,5 ng/ml de plasma) sont assez proches les unes des autres. A première vue, cela peut sembler étonnant mais Sepúlveda *et al.* (2002) remarquaient également des valeurs de 11-KT plasmatique très proches entre les deux sexes chez des achigans prélevés dans quatre sites, même durant la période de reproduction. Notons que les valeurs les plus importantes sont enregistrées chez les mâles, ce qui est normal pour une concentration plasmatique d'androgène. Les chevaines de la Semois à Chiny possèdent des concentrations plasmatiques en 11-KT qui diffèrent significativement de concentrations observées sur d'autres stations. Ainsi, chez les mâles, la concentration plasmatique en 11-KT est significativement plus élevée que chez les individus de la Meuse à Wanze. En ce qui concerne les femelles, elles possèdent des concentrations plasmatiques significativement plus faibles que les individus de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont. Il paraît cependant difficile d'attribuer cette différence seulement à une contamination environnementale. En effet, de nombreux facteurs sont susceptibles de faire varier plus ou moins rapidement une concentration plasmatique en stéroïde. Parmi ceux-ci nous pouvons citer la température, la photopériode ou le stress (Rinchard *et al.*, 1998).

En ce qui concerne les autres stéroïdes (T et E2), nous n'avons jamais été en mesure de différencier les stations sur base de leurs concentrations plasmatiques. Les mesures de T atteignent des valeurs plus élevées (5,8 ng/ml de plasma, en moyenne, pour les mâles et 7,8



ng/ml de plasma, en moyenne, pour les femelles) tout comme les concentrations plasmatiques en E2 (en moyenne, 6,1 ng/ml de plasma chez les mâles et 7,5 ng/ml de plasma chez les femelles). Ces valeurs d'E2 semblent toutefois élevées et pourraient être dues à des problèmes techniques rencontrés lors de la réalisation de la courbe standard. Néanmoins, les concentrations restent comparables entre stations et entre sexes, mais pas par rapport aux autres stéroïdes. Le fait de n'observer aucune différence entre sexe n'a rien d'aberrant quand on sait que la testostérone est en réalité un précurseur de l'E2. Chez les femelles, au cours de la maturation, les concentrations plasmatiques en T et en E2 augmentent de concert. La conversion de la T en E2 par l'enzyme 17 $\beta$ -aromatase cesse généralement un peu avant l'ovulation. Les concentrations en E2 chutent alors pour retrouver un niveau basal alors que la T s'accumule et atteint des valeurs souvent élevées. Ces résultats sont entièrement compatibles avec la période d'échantillonnage. De fait, nous avons certainement capturé les chevaines durant la période de ponte, quand les concentrations plasmatiques en E2 chez les femelles avaient chuté pour retrouver des valeurs basales, proches de celles que l'on retrouve chez les individus mâles alors que la T commençait à s'accumuler sans être convertie en E2. Comme nous l'avons déjà mentionné, les valeurs observées pour les concentrations en E2 semblent relativement importantes pour être des concentrations plasmatiques basales. La littérature comportant peu de références concernant les concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels chez le chevaine, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette espèce possède naturellement des niveaux élevés de stéroïdes sexuels. Pottinger *et al.* (2000) signalaient que le chevaine possédait des concentrations plasmatiques en stéroïdes comparables à celles rencontrées chez les autres cyprinidés. Rinchard *et al.* (1998) notaient que les cypriniformes possédaient des concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels de l'ordre de 10 ng/ml de plasma mais que certains poissons (salmonidés) pouvaient montrer des valeurs de l'ordre de 100 ng/ml de plasma. Cependant, lorsque Rinchard *et al.* (1997) travaillaient sur trois cyprinidés (gardon, ablette et brème bordelière) ils n'observaient jamais de concentrations plasmatiques en E2 supérieures à 4 ng/ml de plasma. L'hypothèse d'une surestimation des valeurs due à une courbe standard peu fiable semble être une meilleure explication. Notons toutefois que l'absence de différences significatives entre les concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels mesurées chez les chevaines capturés sur les différentes stations nous permet de penser que le contrôle endocrinien de la reproduction chez les individus reproducteurs de chacun des sites étudiés ne subit pas d'altération majeure. Ceci pourrait être confirmé par l'étude d'un profil temporel montrant l'évolution des concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels des chevaines au cours d'un cycle de reproduction complet. L'étude histologique de la structure des gonades représente une méthode directe d'évaluation de l'impact d'une pollution sur le système reproducteur des géniteurs. D'autres indicateurs pourraient également être utilisés. Ainsi, la qualité du sperme peut être évaluée par le système CASA (Kime, 1999). La concentration plasmatique en vitellogénine, beaucoup moins pulsatile que les stéroïdes et donc moins sujette à de grands écarts inter-individuels, peut être utilisée pour mettre en évidence soit une altération de la vitellogenèse si elle est mesurée chez les femelles, soit la présence de perturbateurs endocriniens à action oestrogénique si elle est importante chez les mâles.

### Populations de chevaines

Les populations de chevaines des sites de référence (Semois à Chiny et Ourthe en amont de Maboge) montrent une structure équilibrée avec beaucoup de jeunes individus témoins d'un bon recrutement. La station de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont comporte peu d'individus (n=15). Néanmoins, cette station est dominée par les jeunes individus, les classes de tailles supérieures étant peu abondantes et discontinues. Ceci s'explique par le fait



que cette station a subi une grave pollution par l'aluminium (septembre 2002). Ainsi, les jeunes individus auraient été moins touchés et auraient pu survivre grâce à leur mode de vie littoral. En effet, Keith & Allardi (2001) soulignaient que les jeunes chevaines préfèrent vivre près des bords, là où l'eau est peu profonde et le courant moins vif. Ces zones formeraient en quelque sorte des « refuges » pour lesquels les échanges avec le cours principal de la rivière sont relativement réduits, ce qui a pu les préserver partiellement vis-à-vis de la pollution alors que les individus plus âgés au mode de vie « pélagique » (entendons par là « éloigné des bords ») auraient été plus sérieusement affectés. Par contre, les stations du Ton à Lamorteau et de la Mehaigne à Wanze sont beaucoup plus déséquilibrées avec très peu de jeunes individus, ce qui montre une altération du recrutement. Cette rareté des jeunes individus peut s'expliquer de deux manières : soit il s'agit d'une altération de la fonction reproductrice touchant les géniteurs, soit les stades jeunes, les larves et/ou les œufs sont plus gravement atteints par la pollution vu la sensibilité plus importantes des stades précoces (Adams *et al.*, 1992). Notons que les deux phénomènes peuvent aussi avoir lieu en même temps. Comme nous l'avons déjà mentionné, la manière la plus efficace et la plus directe pour vérifier une altération du processus de reproduction chez les géniteurs est certainement l'étude histologique des gonades (Kime, 1999).

### Communautés ichthyologiques

Sur base de l'examen global des peuplements ichthyologiques et des métriques étudiées, nous avons pu mettre en évidence une altération de la structure des communautés sur trois stations : le Ton à Lamorteau, la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont et la Mehaigne à Wanze.

Remarquons que la biomasse totale ainsi que la diversité de la station de l'Ourthe en amont de Maboge est certainement sous-estimée étant donné que le secteur échantillonné était assez uniforme. Vu les difficultés d'accès (rivière fortement encaissée, chemins d'accès impraticables), nous avons été contraints de pêcher un long radier flanqué en rive gauche d'une coulée plus profonde et au courant relativement vif. Cependant, lors de la recherche de gros chevaines supplémentaires pour les prélèvements d'organes, nous avons capturé trois espèces supplémentaires (ombre, hotu et brochet). Néanmoins, l'échantillonnage réalisé permettait déjà de constater que le peuplement ichthyologique du site était caractéristique des stations peu altérées. Bien qu'une biomasse plus faible que celle du site de référence soit enregistrée sur le Ton à Lamorteau, nous avons remarqué des biomasses plus élevées que dans les sites de référence sur la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont et la Mehaigne à Wanze. Ceci peut être expliqué par la prolifération rapide d'espèces opportunistes et tolérantes en matière de qualité de l'eau comme le gardon sur la Mehaigne. Par contre, c'est l'ombre, espèce sensible à la pollution, qui domine la biomasse de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont. Nous y reviendrons plus loin.

Sur les trois sites les plus altérés, la tendance est au remplacement des espèces les plus polluo-sensibles par d'autres plus tolérantes. Ainsi, le barbeau est souvent supplanté par le chevaine et surtout par le goujon, espèce qui occupe la même guildes d'habitat mais beaucoup plus tolérante en matière de qualité de l'eau. Sur la Mehaigne à Wanze, c'est le gardon, espèce ubiquiste et opportuniste par excellence qui domine le peuplement, occupant les niches écologiques désertées par les espèces plus exigeantes. De même, le hotu et les salmonidés (truite et ombre) sont en forte régression, exception faite du site de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont où l'ombre domine le peuplement. Les individus capturés ne constituaient cependant pas une population équilibrée, il s'agissait exclusivement de poissons compris entre



24 et 28 cm, soit des individus âgés de deux ans. Selon l'agent du Service de la Pêche responsable de ce triage, ces poissons seraient originaires de l'Ourthe et tenteraient de recoloniser le secteur situé avant le petit barrage de Vaux-sous-Chèvremont qui avait été gravement touché par la pollution de septembre 2002 par les sels d'aluminium (Crahay, communication personnelle). L'ombre étant une espèce à cycle de vie court, elle est apte à reconstituer rapidement une population sur un site ayant subi une pollution accidentelle. Ce n'est pas le cas des espèces à cycle de vie plus long comme le barbeau ou le hotu pour lesquelles la reconstitution des stocks s'accompagne presque toujours d'une modification structurelle du peuplement avec un remplacement des espèces sensibles par des espèces plus tolérantes (Philippart & Vranken, 1983). Le barrage-déversoir de Vaux-sous-Chèvremont constitue malheureusement un obstacle majeur à la libre circulation des poissons qui entravera certainement la recolonisation de la basse Vesdre par les ombres de l'Ourthe. Le chabot, espèce benthique très intolérante, régresse fortement (Ton à Lamorteau) ou disparaît totalement (Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont) au profit de la loche ; bien que le chabot domine encore celle-ci sur la Mehaigne à Wanze. Ainsi, le rapport « chabot/loche » élevé enregistré pour cette station est essentiellement dû à la rareté de la loche (3 individus). Des pêches antérieures réalisées par le Service de la Pêche confirment la rareté de la loche pour ce site puisqu'un seul individu avait été capturé lors des deux passages successifs.

La diversité est un paramètre en régression sur les trois stations altérées. Ce sont de plus les espèces benthiques qui sont principalement touchées. Ceci peut s'expliquer par des apports importants en matières en suspension, matière organique et nutriments susceptibles d'entraîner une eutrophisation du milieu, souvent accompagnée d'un déficit en oxygène à proximité du fond et d'envasement. Tout ceci étant couplé au comportement particulier de certains polluants peu hydrosolubles qui ont une forte affinité à l'adsorption sur les particules fines et qui se retrouvent souvent concentrés dans les sédiments.

La station de l'Ourthe à Comblain-la-tour, considérée comme altérée par les PCB lors des recherches du LEAE (concentrations musculaires dépassant les 375 ng/g de poids frais chez les anguilles capturées sur ce site), ne montre pas d'altération remarquable des communautés ichthyologiques.

#### Approche holistique

Le tableau 14 montre une synthèse des réponses observées par rapport à un des deux sites de référence pour les différents paramètres mesurés au cours de cette étude. Les communautés ichthyologiques sont altérées sur les stations du Ton à Lamorteau, de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont et de la Mehaigne à Wanze. La tendance principale est une baisse de diversité, surtout marquée chez les espèces benthiques accompagnée par le remplacement des espèces intolérantes à l'altération de la qualité de l'eau par des espèces plus résistantes. Le barbeau se retrouve ainsi souvent dominé, voire totalement remplacé par le chevaine et surtout par le goujon. Cependant, si le chevaine fait toujours partie des deux espèces dominant la biomasse ichthyologique de ces trois stations, ses populations montrent néanmoins des structures déséquilibrées, pauvres en jeunes individus sur les sites du Ton à Lamorteau et de la Mehaigne à Wanze. Cette rareté des jeunes classes d'âge peut être expliquée par deux hypothèses : soit la fonction reproductive est altérée chez les adultes reproducteurs, soit la survie des stades précoces (œufs, larves et/ou jeunes), généralement plus sensibles, est compromise. L'étude des concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels ne semble pas montrer de perturbation du contrôle endocrinien de la reproduction chez les géniteurs. De même, les valeurs obtenues pour le RGS permettent d'affirmer que les gonades des chevaines



reproducteurs (mâles et femelles) ne subissent pas de profondes altérations sur les sites concernés. Les valeurs de RHS confirment indirectement le bon fonctionnement de la vitellogenèse chez les chevaines femelles des différentes stations. Néanmoins, tous ces paramètres ne sont que des mesures indirectes relative à la fonction reproductrice. Pour confirmer totalement les hypothèses avancées, un examen histologique des gonades, qui constitue une mesure directe de l'altération de la fonction reproductrice, pourrait être envisagé ultérieurement grâce aux fragments de gonades conservés dans du liquide de Bouin. Si la reproduction des adultes ne semble être affectée sur aucun des deux sites, la survie des stades précoces paraît plus incertaine. En effet, les chevaines de ces deux stations possèdent une activité EROD significativement plus élevée que les individus d'au moins un des deux sites de référence, ce qui démontre que les chevaines du Ton à Lamorteau et de la Mehaigne à Wanze sont exposés à des doses sublétales de polluants inducteurs de l'EROD (rejets de l'usine de pâte à papier Burgo-Ardenne pour le Ton à Lamorteau, pollution plus diffuse d'origine agricole et industrielle, notamment par les PCB sur la Mehaigne à Wanze). La survie des stades précoces est peut-être dès lors compromise et le recrutement diminué suite à la disparition d'une partie du stock généré par les adultes reproducteurs. Le cas de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont diffère du fait de la pollution aiguë par l'aluminium survenue en septembre 2002. Ici, seuls quelques jeunes individus au mode de vie littoral auraient échappé aux concentrations létales en polluant. Ils constituent donc la portion la plus importante de la population. Les concentrations en PCB observées dans les muscles des chevaines semblaient suffisamment importantes pour induire une activité EROD élevée. Cependant, nous n'avons pas observé de différence significative entre les valeurs EROD des chevaines de la Vesdre et celles des individus des sites de référence. Ceci est probablement dû à l'inhibition de l'enzyme par des composés métalliques très présents dans cette rivière (Philippart & Vranken, 1983; Didier, 1997).

Nous sommes donc parvenus à démarquer trois stations sur base des grandes tendances observées. Les sites où l'EROD était significativement induite possédaient des communautés ichtyologiques altérées et des populations de chevaines déséquilibrées au niveau des stades jeunes.

### Conflit fidélité – mobilité

En choisissant de travailler avec les poissons comme indicateurs de la qualité de l'environnement, nous nous sommes exposés à ce qu'Attrill & Depledge (1997) ont appelé le conflit fidélité – mobilité. Un avantage des poissons est d'intégrer les conditions présentes sur un grand territoire vu la mobilité élevée de ces animaux. Cependant, lors de l'étude de paramètres relatifs aux niveaux d'organisation inférieurs, une certaine fidélité au site est généralement requise. Le problème se pose notamment lorsque les échantillonnages ont lieu (et c'est le cas ici) pendant la période de reproduction, époque durant laquelle les poissons effectuent généralement des migrations à plus ou moins grande échelle vers une zone de frai. Si celle-ci est altérée par la présence d'un polluant, nous risquons de voir apparaître des réponses de type biochimiques (indicateurs précoces de l'altération du milieu) telles qu'une induction de l'EROD ou de protéines de stress, sans que les niveaux supérieurs d'organisation biologique (ultrastructure de certains organes, indices de condition) ne soient réellement affectés puisque une variation de ces paramètres demanderait une exposition plus longue. A l'inverse, des poissons vivant d'ordinaire dans un environnement pollué mais ayant temporairement migré sur un site de bonne qualité peuvent ne montrer aucune réponse pour des indicateurs précoces de la pollution tout en étant atteints à des niveaux d'organisation plus élevés. Les structures de populations peuvent également être affectées par les déplacements



d'un certain type d'individus. Le chevaine, espèce étudiée lors de ce travail, n'accomplit cependant pas de grands déplacements mais les géniteurs se meuvent généralement vers des zones de frai où ils se regroupent tout au long de la période de reproduction. Ce phénomène a été observé à Comblain-la-tour où les géniteurs s'étaient tous concentrés sur les gravières en dessous du pont, en dehors du bief échantillonné, ce qui nous a empêché de réaliser une étude fiable de la structure de population pour cette station.

#### Aspects méthodologiques liés à la démarche adoptée lors de la réalisation de ce travail

Il est clair que les résultats obtenus au cours de ce type d'étude et la fiabilité des discussions autour de ceux-ci sont largement conditionnés par l'échantillonnage réalisé. Ainsi, nous restons conscients que les relations que nous avons mentionnées entre les différents paramètres étudiés doivent rester des hypothèses émises avec réserve. Nous ne possédons de données que pour un nombre réduit de stations (6) et pour quelques paramètres seulement. Le succès de telles extrapolations serait certainement augmenté si un nombre beaucoup plus important de stations et de paramètres avaient été investigués. Néanmoins, vu l'immense complexité des écosystèmes naturels, l'éventail très large de facteurs intervenant en plus des polluants et les effets synergiques ou antagonistes de ceux-ci, de telles extrapolations doivent demeurer des hypothèses émises avec beaucoup de prudence.

Le nombre de pêches réalisées par site est également à prendre en considération. De fait, il aurait été intéressant de comparer les données obtenues pendant la période de reproduction de l'espèce sentinelle avec des données collectées à d'autres moments (avant et après la reproduction). Les données que nous avons analysées lors de ce travail ne constituent de plus qu'un « instantané » d'un système dynamique en constante évolution ; l'acquisition de données mesurées à d'autres périodes permettrait de comparer l'évolution temporelle de chaque paramètre pour les différentes stations.

Les résultats discutés ici doivent être nuancés par les limites inhérentes à chacune des techniques utilisées, notamment la méthode d'échantillonnage (faible efficacité de capture pour les petites espèces, capacité de fuite des poissons, ...).

Le choix du chevaine comme espèce sentinelle mérite d'être discuté ici. En dépit des avantages liés à l'utilisation de cette espèce (voir synthèse bibliographique), nous avons dû faire face à quelques difficultés lors de nos échantillonnages, celles-ci étant notamment dues aux faibles nombres d'individus capturés sur certains sites. L'utilisation d'une espèce mieux représentée permettrait de résoudre ce problème. Cela réduirait également l'impact des prélèvements lors d'échantillonnages réguliers. Ainsi, le goujon semble convenir à ce type de travail au vu des densités observées sur les stations échantillonnées. De plus, l'étude d'une espèce au mode de vie benthique semble plus appropriée lorsqu'il s'agit d'évaluer les effets de polluants peu hydrosolubles et facilement adsorbables dans les sédiments. Cependant, le principal inconvénient de cette espèce est sa petite taille, limitant le nombre de paramètres à doser sur un même individu. La taille relativement réduite des individus de cette espèce permettrait néanmoins plus facilement la vérification en laboratoire de certaines tendances observées dans le milieu naturel.



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'étude de plusieurs paramètres relatifs à différents niveaux d'organisation biologique nous a donc globalement permis de distinguer trois stations altérées: Le Ton à Lamorteau, la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont et la Mehaigne à Wanze. La station de l'Ourthe à Comblain-la-tour, initialement considérée comme un site altéré ne s'est pas révélée significativement différente des autres stations sur base des paramètres biologiques étudiés.

Parmi les indicateurs biochimiques mesurés, seule l'activité EROD s'est révélée utile pour différencier les stations altérées des sites de référence. Ceci confirme les nombreuses études antérieures approuvant l'utilisation de l'EROD dans des programmes de monitoring de l'environnement (Monod, 1997; Flammarion *et al.*, 1998). L'activité GST et la concentration hépatique en protéines de stress HSP70 ne permettent pas de distinguer les stations entre elles.

Globalement, les paramètres morphologiques de condition générale ne discriminent pas clairement les stations, même si le facteur de condition (K) des chevaines de la Vesdre est plus élevé que celui des individus des autres stations. Les sites de la Vesdre et du Ton montrent également des signes de santé altérée et de parasitisme, ces paramètres n'ayant cependant pas fait l'objet d'une étude régulière.

Les concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels ne permettent pas de différencier efficacement les stations entre elles. Même si quelques différences significatives ont été observées entre stations (pour la 11-KT), nous pouvons clairement affirmer que des mesures ponctuelles de concentrations plasmatiques en stéroïdes sont insuffisantes pour évaluer l'état d'altération du contrôle endocrinien de la reproduction.

Par contre, l'étude des populations de chevaines différencie nettement les sites altérés des stations de référence. Des structures déséquilibrées comportant soit peu d'adultes (Vesdre), soit peu de jeunes individus (Ton et Mehaigne) ont été observées.

Les communautés ichthyologiques des stations dégradées sont clairement altérées, avec une diminution de la diversité, surtout marquée chez les espèces benthiques et un remplacement des espèces polluo-sensibles par d'autres plus tolérantes.

La confrontation des paramètres mesurés à différents niveaux d'organisation biologique nous permet de poser l'hypothèse que les sites où l'activité EROD est significativement plus élevée sont les stations les plus touchées par les xénobiotiques (exception faite de la Vesdre). Des concentrations élevées en polluants, ne montrant cependant pas d'effet apparent sur la fonction reproductive des géniteurs, seraient responsables de mortalités importantes chez les stades précoces particulièrement sensibles. Ceci se vérifierait chez la chevine à l'échelle de la population où une structure déséquilibrée et pauvre en jeunes individus a été observée sur les sites où les valeurs EROD sont les plus élevées. Des peuplements ichthyologiques perturbés ont également été observés sur ces stations. En ce qui concerne la Vesdre, une pollution par l'aluminium aurait entraîné récemment une mortalité presque totale dans les communautés ichthyologiques résidentes. Chez la chevine, seuls quelques stades jeunes au mode de vie littoral auraient été épargnés et constitueraient l'essentiel de la population. L'activité EROD, habituellement bonne indicatrice du niveau d'altération chimique d'une station, montre des valeurs faibles malgré de fortes concentrations en PCB mesurées dans les muscles de quelques individus. Ceci étant probablement dû à l'action d'inhibition des composés métalliques, présents dans la rivière (Philippart & Vranken, 1983; Didier, 1997) sur l'activité de l'enzyme.



Dans l'optique de vérifier les hypothèses avancées et de rendre plus rigoureuse une étude de ce type, un travail préalable en laboratoire semble indispensable. Ainsi, l'exposition *in vitro* d'individus à des doses croissantes d'un polluant et le suivi de plusieurs paramètres biologiques permettraient d'acquérir d'importantes informations quant à la dynamique de réponse et de sensibilité des indicateurs examinés. D'éventuelles expériences d'acclimatation pourraient également être réalisées, ce qui permettrait de comparer les réponses obtenues en stress aigu et en stress chronique. L'étude de poissons contrôles en laboratoire servirait également de référence pour les valeurs obtenues sur le terrain.

Lors de leur étude visant à mettre en relation plusieurs paramètres mesurés à différents niveaux d'organisation biologique, Adams *et al.* (1996) soulignaient que le fait d'observer des patterns d'évolution semblables entre plusieurs indicateurs le long d'un gradient de contamination constituait un "indice" justifiant d'éventuelles extrapolations entre niveaux d'organisation. Un gradient de contamination pourrait donc être étudié en milieu naturel à partir d'un rejet ponctuel bien localisé (par exemple l'usine papetière sur le Ton). Un site de référence serait alors choisi en amont du rejet en plus d'une série de stations situées en aval, à différentes distances du rejet. Plusieurs paramètres relatifs à différents niveaux d'organisation pourraient alors être étudiés le long de ce gradient de contamination.

En plus d'une étude le long un gradient spatial, le suivi des indicateurs biologiques sélectionnés devrait se faire selon un gradient temporel. Cela pourrait être intéressant pour des paramètres comme les concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels, extrêmement variables et peu démonstratives lorsqu'elles sont exprimées sous la forme d'une valeur ponctuelle. Des échantillonnages répétés à différentes périodes permettraient une meilleure approche, en contournant l'aspect réducteur d'un jeu de données ponctuelles correspondant à un "instantané" d'un système dynamique en constante évolution.

D'un point de vue plus méthodologique, les indicateurs testés devraient correspondre au mieux au type d'altération étudié. L'activité EROD semble être le meilleur indicateur biochimique étudié à ce jour, alors que la GST ne paraît pas assez sensible pour détecter certaines pollutions environnementales. D'autres indicateurs plus spécifiques pourraient également être utilisés. Ainsi, si une pollution métallique est détectée, le dosage de métallothionéines pourrait se révéler être un bon indicateur de l'exposition. Si la pollution est plutôt due à des pesticides organophosphorés, l'activité de l'acétylcholinestérase sera alors mesurée. Une évaluation de l'état de santé général des poissons pourra être réalisé selon un indice approprié (HAI ou FHI).

En ce qui concerne les paramètres reproducteurs, le suivi des concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels pourrait être accompagné d'un dosage de la vitellogénine, indicatrice chez les femelles d'éventuelles altérations de la vitellogenèse. Elle pourrait néanmoins aussi être dosée chez les mâles pour détecter une perturbation endocrinienne due à des agents à activité oestrogénique (démontré entre autre pour certains rejets d'usines papetières). Cependant, le seul paramètre permettant l'évaluation d'effets directs sur la reproduction est l'examen histologique des gonades, fortement conseillé pour lier les paramètres reproducteurs à la structure des populations.

L'étude de la structure des populations d'une espèce sentinelle et des communautés ichtyologiques constituerait les niveaux supérieurs d'organisation biologique étudiés.

Le choix de l'espèce sentinelle étudiée dépend de nombreux paramètres, les individus doivent cependant être bien représentés sur chacun des sites étudiés pour fournir un jeu de données statistiquement valables. Il doivent aussi être de taille suffisante à assurer la présence du matériel biologique nécessaire. Néanmoins, dans l'optique d'un éventuel élevage en laboratoire, une taille trop importante constituerait un inconvénient certain. L'espèce étudiée ne doit pas être trop exigeante en matière de qualité du milieu de sorte qu'elle soit présente même sur les sites les plus touchés par la pollution. L'étude en conditions semi-contrôlées (encagement) des mêmes indicateurs biologiques sur des espèces plus sensibles peut amener un complément d'informations.

Cette liste de paramètres biologiques indicateurs de la qualité du milieu est loin d'être exhaustive, de nombreux autres paramètres pourraient être mesurés. Toutefois, il faut garder à l'esprit que l'extrême complexité des écosystèmes aquatiques constitue un sérieux frein à l'extrapolation entre niveaux d'organisation biologique. Cependant, une bonne compréhension des mécanismes d'action des polluants au sein d'un écosystème permet d'agir d'une manière optimale pour tenter de sauvegarder la qualité des milieux aquatiques.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaltonen, T.M., Jokinen, E. I., Lappivaara, J., Markkula, S.E., Salo, H. M., Leppänen, H. & Lammi, R. Effects of primary- and secondary-treated bleached kraft mill effluents on the immune system and physiological parameters of roach. *Aquatic toxicology* **51**, 55-67 (2000).
- Adams, S. M., Crumby, W. D., Greeley, M. S., Ryon, M. G. & Schilling, E. M. Relationships between physiological and fish population responses in a contaminated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**, 1549-1557 (1992).
- Adams, S. M., Greeley, M. S. & Ryon, M. G. Evaluating effects of contaminants on fish health at multiple levels of biological organization: extrapolating from lower to higher levels. *Human and Ecological Risk Assessment* **6**, 1, 15-27 (2000).
- Adams, S. M., Ham, K. D., Greeley, M. S., LeHew, R. F., Hinton, D. E. & Saylor, C. F. Downstream gradients in bioindicator responses: point source contaminant effects on fish health. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**, 2177-2187 (1996).
- AFNOR. Essais des eaux : détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN), normalisation française NF T90-350. *afnor, Tour Europe, Paris*, 9 p. (1992)
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar, M. & Raisuddin, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1523**, 37-48 (2000).
- Ait-Aïssa, S., Analyse in vitro de la pollution par utilisation d'un modèle cellulaire contenant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène de stress HSP70. *Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne* (2000).
- Amiard, J.-C., Caquet, T. & Lagadic, L. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement, in Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. & Ramade, F., Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Tec & Doc, Paris*, pp XXI-XXXI (1998).
- Andersson, T. & Koivusaari, U. Influence of environmental temperature on the induction of xenobiotic metabolism by  $\beta$ -naphthoflavone in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **80**, 43-50 (1985).
- Andres, S., Ribeyre, F., Tourencq, J.-N. & Boudou, A. Interspecific comparison of cadmium and zinc contamination in the organs of four fish species along a polymetallic gradient (Lot river, France). *The Science of Total Environment* **248**, 11-25 (2000).
- Angelier E. Ecologie des eaux courantes. *Tec & Doc, Paris*, 199 p. (2000).
- Armknrecht, S. L., Kaattari, S. L. & Van Veld, P. A. An elevated glutathione S-transferase in creosote-resistant mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Aquatic Toxicology* **41**, 1-16 (1998).
- Arukwe, A. Cellular and Molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction, *Marine Pollution Bulletin* **42**, 8, 643-655 (2001).



Attrill, M. J. & Depledge, M. H. Community and population indicators of ecosystem health: targeting links between levels of biological organization. *Aquatic Toxicology* **38**, 183-197 (1997).

Basu, N., Todgham, A. E., Ackerman, P. A., Bibeau, M. R., Nakano, K., Schulte, P. M. & Iwama, G. K. Heat-shock protein genes and their functional significance in fish, *Gene* **295**, 173-183 (2002).

Behrens, A. & Segner H. Hepatic biotransformation enzymes of fish exposed to non-point source pollution in small streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **8**, 281-297 (2001).

Bickham, J. W., Sandhu, S., Hebert, P. D. N., Lounes, C. & Athwal, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations : implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* **463**, 33-51 (2000).

Bryce, S. A., Hughes, R. M., Kaufmann, P. R. Development of a Bird Integrity Index using bird assemblages as indicators of riparian condition. *Environmental Management* **30**, 2, 294-310 (2002).

Burgeot, T. & Galgani, F. Application de l'EROD chez les poissons marins dans un programme pluridisciplinaire de surveillance de la mer du Nord, in Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. & Ramade, F., Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Tec & Doc, Paris*, 33-56 (1998).

Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M. & Gallo, G. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology* **46**, 67-76 (1999).

Caquet, T. & Lagadic, L. Conséquences d'atteintes individuelles précoces sur la dynamique des populations et la structuration des communautés et des écosystèmes, in Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. & Ramade, F., Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement, *Tec & Doc, Paris*, pp. 265-298 (1998).

Chermanne, B. L'aval de la Vesdre anéanti par un polluant chimique. *Le pêcheur belge*, octobre 2002, p.18.

Cnubben N.H.P., Rietjens I.M.C.M., Wortelboer H., van Zanden J. & van Bladeren P.J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **10**, 141-152 (2001).

Coakley, J., Hodson, P. V., van Heiningen, A. & Cross, T. MFO induction in fish by filtrates from chlorine dioxide bleaching of wood pulp. *Wat. Res.* **35**, 4, 921-928 (2001).

Dajoz, R. Précis d'écologie. Dunod, 7ième édition, Paris (2000).

Descy, J.-P. & Coste M. A test of methods for assessing water quality based on diatoms. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **24**, 2112-2116 (1991).

Descy, J.-P. & Darchambeau F. Evaluation de la qualité biologique de l'eau : des microalgues aux poissons. *Ann Med Milit Belg* **13**, 151-158 (1999).



Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J. & Monod, G. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research* **46**, 1-5, 257-262 (1998).

Dewandel L. Etude comparative de différents indices (physico-chimiques et biocénétiques) reflétant la qualité de l'eau et du biotope. Application aux eaux du bassin de l'Ourthe. *Mémoire de licence, FUNDP, Namur*, 86 p. (1994)

Dhainaut, A., Bonaly, J., Barque, J.-P., Minier, C. & Caquet, T. Protéines de choc thermique et résistance multixénobiotique, in Lagadic, L., Caquet, T. Amiard, J.-C & Ramade, F. Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux. *Masson, Paris*, 67-95 (1997).

Didier, J. Indice biotique d'intégrité piscicole pour évaluer la qualité écologique des écosystèmes lotiques. *Thèse de doctorat, Presses universitaires de Namur*, 313 p. (1997).

Dupont, E. Entretenir les cours d'eau et l'habitat des poissons. *Centre de Recherche de la Nature, des Forêts et du Bois, Ministère de la Région wallonne* (1998).

Egaas, E., Sandvick, M., Fjeld, E., Källqvist, T., Goksøy, A. & Svensen, A. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 & Glutathione-S-Transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.* **122C**, 337-344 (1999).

Everaerst-Poll, M. & Vanden Bosche J.-P. Evaluation biologique de la qualité des cours d'eau, Ministère de la Région Wallonne. *Direction Générale des Ressources Naturelles et de l'Environnement*, 87 p. (2000)

Fostier, A. & Jalabert, B. Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various preovulatory stages: changes in plasma hormone levels and *in vivo* and *in vitro* responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish Physiology and Biochemistry* **2**, 87-99 (1986).

Feder, M. E. & Hoffmann, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 243-282 (1999).

Flammarion, P., Garric, J. & Monod, G., Utilisation de l'activité enzymatique EROD chez les poissons des hydrosystèmes continentaux, in Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. & Ramade, F., Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Tec & Doc, Paris*, 57-76 (1998).

Flammarion, P., Noury, P. & Garric, J. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental pollution* **120**, 325-330 (2002).

Gernhöfer, M., Pawert, M., Schramm, M., Müller, E. & Triebskorn, R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **8**, 241-260 (2001).

GIREA. Etude d'incidence sur l'environnement de l'usine de pâte à papier de la Cellulose des Ardennes à Harnoncourt. Impacts sur la qualité des milieux aquatiques. 66 pp. + annexes (1992).



GIREA. Impact de l'usine de pâte à papier Burgo-Ardenne sur les milieux récepteurs: le Ton et la Chiers. 18 pp. + annexes (2000).

Gubbins, M. J., Eddy, F. B., Gallacher, S. & Stagg, R. M. Paralytic shellfish poisoning toxins induce xenobiotic metabolising enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Environmental Research* **50**, 479-483 (2000).

Huet, M. Aperçu des relations entre la pente et les populations piscicoles des eaux courantes. *Revue Suisse d'Hydrobiologie* **11**, 332-351 (1949).

Hughes, R. M. & Oberdorff, T. Applications of IBI concepts and metrics to waters outside the United States and Canada, in Assessing the sustainability and biological integrity of water resources using fish communities (Ed. T.P. Simon), *Lewis press, Boca Raton, FL, USA*, 79-83 (1999).

Hugla, J.-L. Dynamique de transfert des biphényles polychlorés (PCB) chez le barbeau (*Barbus barbus*) et analyse des risques écotoxicologiques pour les populations naturelles: incidence sur la reproduction et sur les fonctions hépatiques. *Thèse de doctorat, Laboratoire de morphologie, systématique et écologie animales, Université de Liège* (1994).

Hugla, J.-L., Philippart, J.-C., Kremers, P., Goffinet, G. & Thomé, J.-P. PCB contamination of the common barbel, *Barbus barbus* (Pisces, Cyprinidae), in the river Meuse in relation to hepatic monooxygenase activity and ultrastructural liver changes. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* **29**, 1, 135-145 (1995).

IBN. Qualité biologique des cours d'eau : détermination de l'indice biotique se basant sur les macroinvertébrés aquatiques. NBN T92-402. *Institut belge de normalisation*, 10 p. (1984).

Janssen, P. A. H., Lambert, J. G. D., Vethaak, A. D. & Goos, H. J. Th. Environmental pollution caused elevated concentrations of oestradiol and vitellogenin in female flounder, *Platichthys flesus* (L.). *Aquatic Toxicology* **39**, 195-214 (1997).

Janz, D. M., McMaster, M. E., Munkittrick, K. R. & Van Der Kraak, G. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicology and applied pharmacology* **147**, 391-398 (1997).

Janz, D. M., McMaster, M. E., Munkittrick, K. R. & Van der Kraak, G. Elevated ovarian follicular apoptosis & heat-shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicology and Applied Pharmacology* **147**, 391-398 (1997).

Janz, D. M., McMaster, M. E., Weber, L. P., Munkittrick, K. R. & Van der Kraak, G. Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis and HSP70 expression in fish exposed to bleached kraft mill effluent. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **58**, 620-625 (2001).

Jokanovic, M. Biotransformation of organophosphorus compounds, *Toxicology* **166**, 139-160 (2001).

Karr, J. R. Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries* **6**, 21-27 (1981).



- Karr, J. R., Fausch, K. D., Angermeier, P. L., Yant, P. R. & Schlosser, I. J. Assessing biological integrity in running waters: a method and its rationale. III. *Nat. Hist. Surv. Spec. Publ.* 5 (1986).
- Keith, P. & Allardi, J. Atlas des poissons d'eau douce de France. Edition Museum National d'Histoire Naturelle (2001).
- Kime, D. E. Endocrine disruption in fish. Kluwer Academic Publishers, MA. 396 p. (1998).
- Kime, D. E. A strategy for assessing the effects of xénobiotics on fish reproduction. *The Science of Total Environment* **225**, 3-11 (1999).
- Kolkwitz, R. & Marson, M. Okologie der tierischen Saprobien. *Int. Rev. Hydrobiol.* **2**, 126-152 (1908).
- Köhler H-R, Bartussek C, Eckwert H, Farian K, Gränzer S, Knigge T & Kunz N. The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. *J. Aquat. Ecosys. Stress Recov.* **8**, 261-279 (2001).
- Kovacs, T. G., Martel, P. H. & Voss, R. H. Assessing the biological status of fish in a river receiving pulp and paper mill effluents. *Environmental Pollution* **118**, 123-140 (2002).
- Kramarz, P. & Stark, J. D. Population level effects of cadmium and the insecticide imidacloprid to the parasitoid, *Aphidius ervi* after exposure through its host, the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris), *Biological control*, in press.
- Lagadic, L., Caquet, T. & Amiard, J.-C. Introduction : Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions, in Lagadic, L., Caquet, T. Amiard, J.-C & Ramade, F., Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux. *Masson, Paris*, 1-10 (1997).
- Lam, P. K. S. & Gray, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* **46**, 182-186 (2003).
- Li Ma, X., Cowles, D. L. & Carter, R. L. Effects of pollution on genetic diversity in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* and the acorn barnacle *Balanus glandula*. *Marine Environment Research* **50**, 1-5, 559-563 (2000).
- Liu, J. H. & Morton, B. The impacts of pollution on the growth, reproduction and population structure of Hong Kong Limpets. *Marine Pollution Bulletin* **36**, 2, 152-158 (1998).
- Malbrouck, C., Trausch, G., Devos, P. & Kestemont, P. Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **135C**, 39-48 (2003).
- Martinez-Lara, E., Toribio, F., López-Barea, J. & Bárcena, J. A. Glutathione -S-Transferase isoenzyme pattern in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants. *Comp. Biochem. Physiol.* **113C**, 2, 215-220 (1996).
- Masson, N., Guérol, F. & Dangles, O. Use of blood parameters in fish to assess acidic stress and chloride pollution in French running waters. *Chemosphere* **47**, 467-473 (2002).



McGeer, J. C., Szebedinszky, C., McDonald, D. G. & Wood, C. M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic toxicology* **50**, 231-243 (2000).

McMaster, M. E., Van der Kraak, G. J. & Munkittrick, K. R., Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *Comp. Biochem. Physiol.* **112C**, 2, 169-178 (1995).

Micha, J.-C. & Noizet, J.-L. Evaluation biologique de la pollution des ruisseaux et rivières par les invertébrés aquatiques. *Probio-revue* **5**, 1, Association Francophone des Professeurs de Biologie de Belgique (1982).

Micha, J.-C. Les bases scientifiques d'une politique de contrôle de la pollution des eaux de surface. *Trib. Cebedeau* **465-466**, **35**, 341-356 (1982).

Michel, X., Narbonne, J.-F., Mora, P., Daubèze, M., Ribera, D., Lafaurie, M., Budzinsky, H. & Garrigues, P., Indicateurs biochimiques de pollution des écosystèmes côtiers : expérience du groupe interface chimie-biologie des écosystèmes marins (GICBEM), in Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. & Ramade, F., Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Tec & Doc, Paris*, 9-32 (1998).

Ministère de la Région wallonne. L'environnement wallon à l'aube du XXI<sup>e</sup> siècle, approche évolutive (2000).

Moe, S. J., Stenseth, N. C. & Smith R. H. Density-dependent compensation in blowfly populations give indirectly positive effects of a toxicant. *Ecology*, in press.

Monod, G. L'induction du cytochrome P4501A, in Lagadic, L., Caquet, T. Amiard, J.-C & Ramade, F. Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux. *Masson, Paris*, 33-51 (1997).

Monteiro, P. R. R., Reis-Henriques, M. A. & Coimbra, J. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* **49**, 453-467 (2000).

Oberdorff, T., Pont, D., Hugueny, B. & Porcher, J.-P. Development and validation of a fish-based index for the assessment of "river health" in France. *Freshwater Biology* **47**, 1720-1734 (2002).

Otto, D.M.E. & Moon, T.W. Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **31**, 141-147 (1996).

Paoletti, M. G. & Cantarino, C. M. Sex ratio alterations in terrestrial woodlice populations (Isopoda: Oniscidea) from agroecosystems subjected to different agricultural practices in Italy. *Applied Soil Ecology* **19**, 113-120 (2002).

Payne, J. F., Fancey, L. L., Rahimtula, A. D. & Porter, E. L. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.*, **86C**, 2, 233-245 (1987).



Perez-Lopez M., Anglade P., Bec-Ferté M.P., Debrauwer L., Perdu E., Cravedi J.P. & Rouimi P. Characterization of hepatic and extrahepatic glutathione S-transferases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their induction by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Fish Physiol. Biochem.* **22**, 21-32 (2000).

Philippart, J.-C. Age et croissance du cheveine *Leuciscus cephalus* (L.) dans l'Ourthe et la Berwine. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique* **102**, 1-2, 47-82 (1972).

Philippart, J.-C. & Vranken, M. Atlas des poissons de Wallonie. Distribution, ecologie, ethologie, pêche, conservation. *Cahiers d'ethologie appliquée, à la protection et à la conservation de la vie sauvage, à la gestion et au contrôle des ressources et productions animales* **3**, 1-2, Institut de Zoologie de l'Université de Liège, 395 pp. (1983).

Pickering, A. D. & Pottinger, T. G. Biochemical effects of stress. *Biochemistry and molecular biology of fishes* **5**, 349-371 (1995).

Pottinger, T. G., Carrick, T. R., Applebye, A. & Yeomans, W. E. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: is the chub *Leuciscus cephalus* a cortisol-resistant teleost? *General and Comparative Endocrinology* **120**, 1, 108-117 (2000).

Porter, C. M. & Janz, D. M. Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. *Ecotoxicology and Environmental safety* **54**, 199-206 (2003).

Rinchard, J. & Kestemont, P. Comparative study of reproductive biology in single- and multiple-spawner cyprinid fish. I. Morphological and histological features. *Journal of Fish Biology* **49**, 883-894 (1996).

Rinchard, J. & Kestemont, P. Comparative study of reproductive biology in single- and multiple-spawner cyprinid fish. II. Sex steroid and plasma protein phosphorus concentrations. *Journal of Fish Biology* **50**, 169-180 (1997).

Rinchard, J., Poncin, P. & Kestemont, P. Croissance ovocytaire et régulation stéroïdienne chez les poissons à pontes uniques et multiples: une revue. *Annls Limnol.* **34**, 2, 211-225 (1998).

Sanders, B. M. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective, critical reviews. *Toxicology* **23**, 1, 49-75 (1993).

Schlenk, D., Perkins, E. J., Hamilton, G., Zhang, Y. S. & Layher, W. Correlation of hepatic biomarkers with whole animal and population-community metrics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**, 2299-2309 (1996).

Sepúlveda, M. S., Johnson, W. E., Higman, J. C., Denslow, N. D., Schoeb, T. R. & Gross, T. S. An evaluation of biomarkers of reproductive function and potential contaminant effects in Florida largemouth bass (*Micropterus salmoides floridanus*) sampled from the St. Johns river. *The Science of the Total Environment* **289**, 133-144 (2002).

Siligato, S. & Böhmer, J. Evaluation of biological integrity of a small urban stream system by investigating longitudinal variability of the fish assemblage. *Chemosphere* **47**, 777-788 (2002).



van der Oost, R., Lopes, S. C. C., Komen, H., Satumalay, K., van den Bos, R., Heida, H. & Vermeulen, N. P. E. Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*): use of bioactivation ratio as a biotransformation index (BTI), *Marine Environmental Research* **46**, 1-5, 315-319.

Vasseur, P. & Cossu-Leguille, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* **28**, 711-717 (2003).

Ventura, E.C., Gaelzer, L. R., Zanette, J., Marques, M.R.F. & Bainy, A. C. D. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. *Marine Environmental Research* **54**, 775-779 (2002).

Viganò, L., Camoirano, A., Izzotti, A., D'Agostini, F., Polesello, S., Francisci, C. & De Flora, S. Mutagenicity of sediments along the Po river and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. *Mutation Research* **515**, 125-134 (2002).

Villeneuve, D. L., Villalobos, S. A., Keith, T. L., Snyder, E. M., Fitzgerald, S. D. & Giesy, J. P. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature male carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* **47**, 15-28 (2002).

Vindimian, E., Namour, P., Migeon, B. & Garric, J. In situ pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish: barbel (*Barbus barbus*), Chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). *Aquat. Toxicol.* **21**, 255-266 (1991).

Weber, L. P., Diamond, S. L., Bandiera, S. M. & Janz, D. M. Expression of HSP70 & CYP1A protein in ovary & liver of juvenile rainbow trout exposed to  $\beta$ -naphthoflavone. *Comp. Biochem. Physiol.* **131C**, 387-394 (2002).

Weis, J. S., Samson, J., Zhou, T., Skurnick, J. & Weis, P. Evaluating prey capture by larval mummichog (*Fundulus heteroclitus*) as a potential biomarker for contaminants. *Marine Environmental Research* **55**, 1, 27-38 (2003).

Wright, J. F., Stutcliffe, D. W., Furse, M. T. Assessing the biological quality of fresh waters (RIVPACS and other techniques). *Freshwater biological association, Ambleside, Cumbria, U.K.*, 373 p. (2000).